FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 72

# Contribution à l'Étude du Milieu de Tarshis pour la Culture du Bacille Tuberculeux

Travail de la Clinique Médicale
et du Centre de Recherche Pneumologique de l'Université

Professeur : **C. MATTEI**

## THÈSE

soutenue publiquement à la Faculté de Médecine de Marseille
LE 11 JUILLET 1957
par

Georges BERTOCCHIO

Né le 28 Mars 1931, à Chateauneuf-sur-Loire (Loiret)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Examinateurs de la Thèse**

MM. C. MATTEI, *Président.*
P. GIRAUD
J. RANQUE
P. LAVAL
J. DUNAN

Imprimerie F. BOJARDI
1, Rue Louis-Grobet
MARSEILLE

1957

# Contribution à l'Étude du Milieu de Tarshis pour la Culture du Bacille Tuberculeux

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N°

# Contribution à l'Étude du Milieu de Tarshis pour la Culture du Bacille Tuberculeux

Travail de la Clinique Médicale
et du Centre de Recherche Pneumologique de l'Université

Professeur : **C. MATTEI**

## THÈSE

soutenue publiquement à la Faculté de Médecine de Marseille

**LE 11 JUILLET 1957**

par

Georges BERTOCCHIO

Né le 28 Mars 1931, à Chateauneuf-sur-Loire (Loiret)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Examinateurs de la Thèse**

MM. C. MATTEI, *Président.*
P. GIRAUD
J. RANQUE
P. LAVAL
J. DUNAN

R. UNIV
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Imprimerie F. BOJARDI
1, Rue Louis-Grobet
MARSEILLE

1957

# PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen : G. MORIN

Secrétaire Principal : J. COMTE

Assesseur : J. DELPHAUT

Bibliothécaire : M^lle^ PERRIN

## PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GABRIEL, JOYEUX, HECKENROTH, MOIROUD, MONGES, RIMATTEL, ROCHE.

## PROFESSEURS

| | |
|---|---|
| Anatomie | GRISOLI |
| Anatomie Pathologique | GASTAUT |
| Bactériologie et Pathologie Générale | BRAHIC |
| Botanique et Cryptogamie | PELLISSIER |
| Cardiologie Clinique et Expérimentale | JOUVE |
| Chimie | DUMAZERT |
| Chimie Analytique et Hydrologie | ARNOUX |
| Chimie Médicale | DERRIEN |
| Clinique Chirurgicale | CARCASSONNE |
| Clinique Chirurgicale | N... |
| Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédie | SALMON |
| Clinique Chirurgicale Thérapeutique et Chirurgie Expérimentale | De VERNEJOUL |
| Clinique Dermato-Syphiligraphique | CHARPY |
| Clinique Exotique | BLANC |
| Clinique des Maladies du Système Nerveux | POURSINES |
| Clinique Médicale | MATTEI |
| Clinique Médicale | POINSO |
| Clinique Médicale Thérapeutique | OLMER J. |
| Clinique des Maladies des Voies Digestives et de la Nutrition | RECORDIER |
| Clinique Médicale Infantile | GIRAUD |
| Clinique Neuro-Chirurgicale | PAILLAS |
| Clinique Obstétricale et Gynécologique | CHOSSON |
| Clinique Ophtalmologique | JAYLE |
| Clinique de Stomatologie | MARONNEAUD |
| Clinique Urologique | CHAUVIN |
| Histologie | PICARD |
| Hygiène et Médecine Sociale | SAUTET |

| | |
|---|---|
| Matière Médicale | BALANSARD |
| Médecine Légale et Médecine du Travail | MOSINGER |
| Parasitologie | RANQUE |
| Pathologie Interne | AUDIER |
| Pathologie Chirurgicale | DOR |
| Pharmacologie | MERCIER F. |
| Pharmacie Chimique et Toxicologie | VIGNOLI |
| Pharmacie Galénique | DELPHAUT |
| Physiologie | MORIN |
| Physique Médicale | DUBOULOZ |
| Thérapeutique | PIERI |

## PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ROUX
DONNET
MOURGUE

## MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. BERNARD Pierre
BOURRET
DEPIEDS
DESANTI
GAMBARELLI
GREBUS
LISSITZKY
MERCIER J.
PASTOR
PAYAN
TAMALET

## AGREGES EN EXERCICE

MM. APPAIX
BERNARD René
CHARPIN
CHAUVIN
CREMIEUX
DEVIN
GRANJON
LAVAL
METRAS
MONGES H.
MOUREN
ORSINI
PAOLI
RAYBAUD
SERMENT

## AGREGES LIBRES

MM. BERTHIER
FIGARELLA
HENRY
IMBERT
LAMY
LENA
OLLIVIER
OURGAUD
VAGUE

### Chargé des fonctions de Maître de Conférences

Histologie ..... M. STAHL

### Chargé des fonctions d'Agrégé

Hygiène et Médecine Sociale ..... M. GEVAUDAN

A MA FEMME

*dont le soutien et la confiance nous ont toujours été d'un grand réconfort.*

A MON FILS

*que d'espoirs il porte en lui !*

A MES PARENTS

*dont la vie sera pour moi un exemple, cette modeste récompense de la tendresse qu'ils m'ont toujours prodiguée.*

A MA BELLE-SŒUR

A MES BEAUX-PARENTS

*pour l'affection qu'ils me témoignent.*

A MA FAMILLE

## A MONSIEUR LE PROFESSEUR C. MATTEI

*Professeur de Clinique Médicale,*
*Médecin des Hôpitaux,*
*Membre correspondant National*
*de l'Académie de Médecine*

Après avoir eu la grande amabilité de nous suggérer notre sujet de thèse, il nous a fait l'immense plaisir d'en accepter la présidence.

Sa personnalité nous a profondément influencé. Sa bonté, son dévouement à la cause des malades, ses qualités d'homme et de médecin en ont fait un « Maître » dont l'exemple est le plus bel enseignement qui puisse être prodigué.

Qu'il soit assuré de notre profond respect et de notre indéfectible attachement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. GIRAUD,

*Professeur de Clinique Médicale Infantile,*
*Médecin des Hôpitaux*

En reconnaissance de son bienveillant accueil et de tout l'intérêt qu'il a bien voulu nous porter.

Qu'il nous soit permis de le remercier de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de siéger dans notre Jury de thèse.

## A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. RANQUE

*Professeur Agrégé de Parasitologie*
*à la Faculté de Médecine*

Il nous a toujours manifesté la plus grande sympathie et nous a grandement facilité la tâche. Qu'il soit bien vivement remercié du plaisir qu'il nous a fait en acceptant de siéger dans ce Jury.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. LAVAL

*Professeur agrégé à la Faculté de Médecine*

Il a suivi la réalisation de cette thèse, nous faisant profiter de ses connaissances innombrables, se dépensant sans compter pour la réussite de ce travail.

Qu'il soit assuré de notre profond attachement et de notre respectueux dévouement.

A MONSIEUR LE DOCTEUR DUNAN

*Chef de laboratoire des Hôpitaux*

Il nous a accueilli dans son laboratoire avec son affabilité coutumière et n'a rien négligé qui puisse nous aider.

Qu'il veuille bien trouver ici le modeste témoignage de notre profonde gratitude.

A MESSIEURS :

Le Professeur CHAUVIN

Le Professeur de VERNEJOUL

Le Professeur SALMON

Le Professeur CHOSSON

Le Professeur BRAHIC

Le Professeur AUDIER

Le Professeur ORSINI

Le Docteur BUISSON

qui ont été nos maîtres dans les Hôpitaux.

A MONSIEUR LE DOCTEUR DASCALOPOULOS

*Chirurgien Chef de l'Hôpital d'Orange*

Pour l'amabilité avec laquelle il nous a toujours conseillé.

A MONSIEUR LE DOCTEUR M. ANGELETTI

*Chef de Clinique Chirurgicale à la Faculté de Médecine*

En reconnaissance de l'intérêt qu'il nous a toujours porté et de l'amitié qu'il a bien voulu nous accorder.

A MONSIEUR LE DOCTEUR P. VINCENT

*Chef de Clinique Médicale Infantile à la Faculté de Médecine*

En remerciement du dévouement qu'il nous a toujours témoigné.

A. MONSIEUR LE DOCTEUR P. FABRE

*Ancien Interne de l'Hôpital Saint-Joseph*

Pour la confiance dont il nous a honoré.

A TOUS NOS AMIS.

# Préambule

L'ESSOR considérable pris par les examens systématiques dans la lutte anti-tuberculeuse, la multiplication des examens radiologiques sont à l'origine de la découverte de nombreux cas de lésions minimes, paucibacillaires.

La disparition rapide des bacilles dans les produits d'expectoration des malades traités par les antibiotiques, la nécessité absolue de mettre en évidence le bacille tuberculeux pour le diagnostic étiologique d'une atteinte au début ou pour la prophyllaxie rigoureuse dans le domaine de la médecine préventive et sociale, la complexité des problèmes biologiques posés par la virulence et la résistance variables des germes, tous ces faits expliquent l'importance de plus en plus grande du laboratoire en phtisiologie.

Les techniques de prélèvement des sécrétions (expectoration, écouvillonnage, tubage gastrique, broncho-aspiration) puis les procédés de mise en évidence du B.K. (enrichissement des sécrétions, homogénéïsation, examen en fluorescence, etc.) ont subi de nombreux perfectionnements.

Les cultures sur milieux appropriés, dont l'intérêt avait été souligné déjà au Congrès de Lille (1939) (OLMER, MATTEI et BERTHIER), sont entrées dans la pratique courante au cours de ces dernières années. Elles sont devenues, avec l'inoculation au cobaye, des examens de routine absolument indispensables pour détecter la présence du bacille de KOCH demeuré latent ou pour constituer le point de départ de recherches utiles sur la virulence ou la résistance d'une souche bactérienne déterminée. Les

discordances qui sont apparues entre les données de la clinique et celles du laboratoire, concernant notamment ces problèmes, paraissent relever en majeure partie des différences qui séparent les phénomènes observés in-vitro et in-vivo.

C'est pourquoi les efforts des techniciens de laboratoire tendent à se placer le plus possible dans des conditions biologiques et biochimiques analogues à celles réalisées chez le sujet vivant.

En ce qui concerne le problème particulier des cultures, on utilise couramment les milieux classiques de PETRAGNANI ou de LOEWENSTEIN. TARSHIS et ses collaborateurs ont eu le mérite de reprendre les milieux au sang. Il nous a paru intéressant d'étudier ce milieu et ses possibilités en tuberculose, car il nous permet précisément de nous rapprocher des conditions humorales.

Nous avons été conduit à réaliser les différentes recherches suivantes :

(1) Valeur du milieu de TARSHIS comme milieu de culture du B. K. Etude comparative avec le milieu de LOEWENSTEIN. Nous avons, chemin faisant, recherché les possibilités de simplification dans la composition et la fabrication d'un milieu au sang.

(2) Utilisation d'un milieu réalisé avec le propre sang du malade pour l'étude de la résistance des B. K. aux antibiotiques afin de nous rapprocher le plus possible de la réalité. Cette étude nous a conduit au dosage des antibiotiques dans le sang, ce qui nous a permis de comparer les courbes de concentrations sanguines en fonction des doses d'antibiotiques et de leur fractionnement dans le nycthémère.

Nous verrons dans nos conclusions ce que l'on peut attendre de ces milieux au sang, car dans l'ensemble nos espoirs n'ont pas été déçus.

# Historique
# des Milieux de Culture

Pour l'observateur superficiel qui parcourrait une bibliographie des travaux consacrés à ce sujet, l'abondance même de ceux-ci risquerait de le décourager et l'inciterait à penser que les recherches ont été menées un peu dans tous les sens, sans homogénéité.

Cette homogénéité, nous nous sommes efforcé de la rechercher, en essayant de dégager les grandes lignes des différentes étapes de la culture du bacille tuberculeux. Certes, ces différentes périodes, nous avons été obligé de les séparer artificiellement pour la commodité de l exposé, mais il va de soi qu'elles s'intriquent intimement et que nous n'avons eu pour but que d'essayer de dégager derrière l'œuvre la pensée qui fait que toutes les grandes découvertes se font dans plusieurs pays en même temps.

## I. — LES TRAVAUX INITIAUX

Après avoir découvert le bacille tuberculeux en 1882, Robert KOCH, dès 1884, obtient une culture en partant de broyat de tubercules pulmonaires sur sérum coagulé de bœuf ou de mouton.

ROUX et NOCARD ont le bonheur de découvrir, dès 1887, les propriétés eutrophiques de la glycérine, et c'est l'année suivante que PAWLOWSKY démontre que le bacille tuberculeux pousse sur pomme de terre.

La même année, BEZANÇON et GRIFFON publient leur article princeps sur le milieu gélose glycérinée au sang, à la Société de Biologie.

Ainsi, en six ans, les données fondamentales concernant la culture du B.K. étaient trouvées et tous les travaux ultérieurs, ou presque, vont tourner autour de ces éléments : glycérine, pomme de terre, sérum et sang. Notons que l'œuf est introduit par CAFALDI, en 1896.

A ce moment-là, pour le sang, il est trop tôt et trop tard : trop tôt, car les expérimentateurs ne veulent se rappeler que des cultures misérables de KOCH sur sérum et les nombreuses souillures du milieu de BEZANÇON ; trop tard, car l'élan est donné pour des recherches créant des milieux de plus en plus complexes à bases de substances organiques variées et surtout à des corps minéraux de plus en plus nombreux.

## II. — LA PERIODE DES MILIEUX SYNTHETIQUES

Nous l'avons baptisée ainsi, quoique improprement, parce qu'elle est basée sur un certain empirisme que la période suivante s'efforcera de justifier par des travaux analytiques.

On assistera ainsi successivement à l'éclosion des milieux de :

— de DORSET, en 1902, et de LUBENAU, en 1907, à l'œuf ;

— de PETROFF, en 1910-1915 : bouillon glycériné à l'œuf et au violet de gentiane, contre les souillures ;

— de SAUTON, en 1912 : milieu synthétique liquide glycériné à 6 pour 100 ;

— de PETRAGNANI, en 1923-1926 : lait, fécule de pomme de terre, œufs, glycérine, peptone, vert malachite ;

— de LOEWENSTEIN, en 1924, qui supprime le lait.

Parallèlement, seul EASTWOOD, en 1907, s'intéresse au sang. Et encore, ne fait-il qu'étudier la pousse du B.K. sur sérum de cheval, de bœuf, de chien, de porc.

A la suite de cette période extrêmement féconde, les publications se raréfient : tout le monde utilise les milieux de SAUTON pour les recherches, et les milieux de LOEWENSTEIN et de PETRAGNANI pour le diagnostic.

On va assister alors à une série de travaux sur les milieux liquides pour le diagnostic rapide et à une analyse des corps pouvant favoriser ou entraver la culture du B.K.

## III. — LA PERIODE ANALYTIQUE

Brusquement, quelques années avant la deuxième guerre mondiale, les recherches reprennent avec une ardeur nouvelle et on assiste à la naissance des deux milieux liquides les plus célèbres, en même temps qu'à une série de travaux sur la biologie du bacille tuberculeux.

### a) Les milieux synthétiques liquides.

C'est leur grande époque. YOUMANS découvre un milieux synthétique simple (ce sera sans doute le dernier milieu simple), auquel il ajoute 10 % de plasma humain citraté.

DUBOS, en 1946, ouvre la porte à de grandes polémiques en trouvant un milieu synthétique très complexe, auquel il ajoute du Tween 80 (ester sorbitique de l'acide mono-oléique) et la fraction V de l'albumine bovine. Ce milieu, de pousse rapide mais peu commode pour le diagnostic courant, a, en outre, le grand mérite de permettre l'étude de toute une série de corps jusque-là peu étudiés (surtout les albumines), corps auxquels on faisait déjà empiriquement jouer un grand rôle. Tous ces travaux, malheureusement, n'ont rien fait pour clarifier la situation.

### b) Les travaux sur le sang.

Pendant cette polémique, certains auteurs n'en continuaient pas moins à étudier la question du sang. Et c'est ainsi que sont publiés successivement les travaux de : KIRSHNER, en 1932 ; POWELSON, en 1934 ; BOISSEVAIN, en 1940 ; FOLEY, en 1946 ; DUBOS, en 1946 ; DUMPHY, en 1947 ; LIPSCHITZ et MILAZZO, en 1947 ; BASTIN, en 1948-49 ; FREOUR et HUET, en 1949. Ces auteurs étudient les propriétés des différents sangs, des différents sérums, etc.

### c) Mais JENSEN améliore le LOEWENSTEIN.

Cependant, ces travaux ne devaient pas avoir le retentissement qui leur était dû car, pendant ce temps, JENSEN avait amélioré le milieu de LOEWENSTEIN en le rendant plus sensible, ce qui en faisait un milieu de diagnostic inégalé. Les travaux vont continuer et même augmenter de volume, de façon importante, mais dans le seul but de l'analyse et sans donner de résultat très marquant. En effet, de ce côté de l'Atlantique, tout le monde emploie le milieu de JENSEN pour le diagnostic, alors que les laboratoires américains lui préfèrent le milieu à l'acide oléique.

## IV. — LE RENOUVEAU DU MILIEU AU SANG (TARSHIS et coll.)

De très nombreux milieux sont alors publiés : notons les milieux de HIRSH au charbon activé, le milieu de CHU qui doit donner des réponses rapides mais qui est d'une complexité telle qu'il décourage à la simple lecture. En somme, la majorité des auteurs semble avoir fait le raisonnement suivant : si nous mettons dans un milieu tous les produits reconnus comme favorables à la pousse du B.K. dans les proportions voulues, nous obtiendrons un milieu supérieur aux milieux classiques. Et, de fait, certains milieux se trouvent sous la forme d'un amalgame où l'on retrouve pêle-mêle : lécithine alcoolique, chlorure d'ammonium, citrate de fer ammoniacal, asparagine, glucose, Tween 80, pénicilline, bien entendu, et même (pourquoi pas ?) sérum humain ou sang.

Et, pendant ce temps, tout le monde semble oublier que la simplicité est souvent, même en bactériologie, synonyme de qualité. TARSHIS aura eu le mérite, sinon de l'originalité — nous y reviendrons — du moins de rappeler ses contemporains à des notions plus saines.

C'est, en effet, en 1951, que TARSHIS publia, avec FRISCH, son premier rapport dans l'« American Revue of Tuberculosis », rapport répété à maintes reprises depuis dans les plus grandes revues mondiales. TARSHIS reprend dans ses travaux le milieu de BEZANÇON et

GRIFFON, c'est-à-dire une gélose glycérinée au sang humain citraté, auquel il fait profiter des dernières acquisitions dans le domaine analytique en restreignant la dose de glycérine à 1 %, la dose d'agar-agar à 1,5 %, et en ajoutant du sang citraté hémolysé fourni par les Centres de Transfusion, dans la proportion de 25 %. La pénicilline sert à protéger contre les souillures. Ce milieu n'est donc pas nouveau, mais le simple fait que, dès son lancement ses résultats ont été trouvés égaux aux milieux classiques, prouve bien que le progrès réalisé en 60 ans n'a pas été très conséquent...

D'emblée, les travaux de TARSHIS ont été jugés, sinon sévèrement, du moins avec beaucoup de réserves en Europe et rares ont été les publications à son sujet. Peut-être les auteurs européens connaissaient-ils déjà trop bien le milieu de BEZANÇON ? Toujours est-il que ce milieu est peu employé dans nos pays et si BASTIN est un fervent partisan des milieux au sang, il n'a jamais consacré à ceux-ci un article aussi enthousiaste que celui de DIONNE, au Canada, a consacré au milieu de TARSHIS. En fait, NINNI et BRETEY, WHITCOMB et coll., CALMELS et BOISVERT, qui connaissent bien la question du sang pour l'avoir longuement étudiée, ne semblent pas attacher grande importance à ce milieu. Par contre, de nombreux laboratoires, avec REINISCH et KAUFMANN, lui accordent un intérêt pour la culture en vue d'une épreuve de résistance, vu son faible prix de revient.

C'est ce désaccord qui nous a incité à l'étude de ce milieu, et nos premiers essais ont été prometteurs.

# La Biologie du Bacille Tuberculeux de Culture

## I. — LE BACILLE TUBERCULEUX DE CULTURE

Il ne nous a pas semblé indifférent de faire ce court paragraphe sur le bacille tuberculeux dans sa forme que l'on pourrait qualifier « de culture ». En effet, si l'on veut bien se rappeler que le bacille de KOCH est un élément vivant un peu à part dans la série des micro-organismes pathogènes pour l'homme, à tel point qu'il a nécessité pour son classement la création d'un groupe spécial : celui des mycobactériacés, on comprendra aisément qu'un germe à la limite des champignons et des levures puisse avoir une vie différente des autres microbes connus.

On peut, en effet, considérer le Mycobactérium tuberculosis, quelle que soit sa variété, comme un parasite, et même un parasite assez strict, puisqu'il ne vit pas sur n'importe quelle espèce animale. « Ce parasite ne trouve ses conditions d'existence que dans le corps de l'homme et des animaux, et il ne peut se développer comme le bacille du charbon en dehors de l'économie animale, dans un milieu ambiant » (Robert KOCH, 1882). Et cela est si vrai que VILLEMIN lui-même, dès 1865, montrait déjà que la maladie était transmissible : à l'homme, au lapin, au cobaye, et plus difficilement : au chien et au chat, mais que les moutons, les poules et les pigeons étaient réfractaires. Donc, à priori, on ne peut pas demander à un parasite de vivre comme un vulgaire staphylocoque. Il faudra à ce germe des éléments nutritifs spéciaux et même vraisemblablement des éléments non chimiquement décelables par nos procédés d'investigation puisque nous sommes dans l'impossibilité de dire pourquoi il pousse particulièrement bien chez l'homme, par exemple, et pas chez d'autres espèces animales. Il semble donc déjà, à

priori, que le B.K, poussera d'autant mieux qu'il se trouvera dans un milieu rappelant plus son milieu d'élection. Ceci est tellement vrai que ce test a été récemment utilisé pour différencier les races bacillaires : ATA et STAIB ont montré que, sur sang de rat, le B.K. bovin pousse abondamment en trois semaines, alors que les B.K. humains et aviaires ne poussaient que beaucoup plus lentement. Il faut donc admettre l'importance d'un facteur qui sera à la fois humoral et tissulaire. Humoral, ces expériences en sont la preuve flagrante ; tissulaire, le facteur de croissance contenu dans un fragment de foie ou de rate de veau ou de bœuf utilisés comme milieux de culture le prouve aussi (A. et L. LUMIERE, 1906).

Il faut donc admettre que le B.K. que l'on cherche à obtenir sur un milieu de culture synthétique est un monstre (BEZANÇON), et on ne peut demander à un élément vivant de transformer son métabolisme sans que cela prenne du temps. Or, tous les bactériologistes ont pu constater, en examinant une culture de B.K., que celle-ci se développait en deux temps bien séparés : un premier temps où la culture, après un temps de latence assez long et variable, met en quelque sorte « le nez à la fenêtre », et un deuxième temps où le germe croît rapidement et en quantité importante.

Nous pouvons essayer d'analyser ces deux temps et d'en tirer des leçons :

— Le premier temps correspond à l'assimilation du milieu de culture par le B.K. : celui-ci prend conscience des nouvelles nourritures qui lui sont données en pâture et modifie son métabolisme en fonction de celles-ci. Nous en prendrons pour témoin le fait que les colonies bacillaires n'ont pas le même aspect suivant les milieux sur lesquels elles poussent, et cette différence ne tient pas uniquement aux variations de pigment coloré puisque une simple modification de pH peut faire varier cette coloration. Cette « gymnastique métabolique » prend un certain temps qui est perdu pour la personne qui a demandé l'examen. C'est ce fait qui a paru justifier, pendant un certain temps, la pratique des grattages systématiques, pratique qui s'est révélée désastreuse pour l'avenir des colonies futures et qui est à peu près abandonnée maintenant.

Un deuxième facteur peut entrer en jeu dans cette période : c'est la présence dans les produits que l'on met dans les milieux, de facteurs d'inhibition qui se trouvent partout : l'agar, le sang lui-même, mais qui agira surtout

sur la deuxième partie du phénomène. Supprimer ces facteurs est un des problèmes les plus importants qui se posent au bactériologiste.

Un troisième facteur, enfin, est mécanique : les cultures sont particulièrement intéressantes, mais difficiles avec des ensemencements pauci-bacillaires ; or, ceux-ci sont traités (et même maltraités) énergiquement en vue d'un enrichissement. Peut-être le B.K. n'est-il pas indifférent à tant d'inattention...

— Le deuxième temps se produit après une phase de latence encore assez remarquable pour être notée : combien de fois, après avoir vu pousser les premières colonies à la limite de la visibilité, n'a-t-on pas attendu de longs jours pour obtenir des cultures évidentes ? Des esprits chagrins pourront évoquer la croissance sur le mode de la progression géométrique... Certes, et la suite nous en donnera la preuve, mais ce mécanisme un peu simpliste n'est pas seul en cause. Ici interviennent, au premier chef, les facteurs d'inhibition dont nous avons déjà parlé. Ils sont tout puissants et règlent les pousses. Peut-être aussi l'épuisement de certaines substances est-il en cause ? Toujours est-il que l'absence de glycérine dans un milieu de TARSHIS, par exemple, nuit considérablement à la richesse du milieu, et ceci, NOCARD et ROUX l'avaient déjà vu il y a bien longtemps. L'absence d'oxygène aussi fait sentir son action, à tel point que l'apport de ce gaz en faible quantité ou tout simplement d'air (HALPERN et KIRCHEIMER) fait croître les colonies de façon plus importante.

Une question importante, elle aussi, est la dissociation des B.K. en deux variétés R et S, de façon différente des autres bactéries.

JENSEN confirme que les bacilles peuvent se présenter sous deux formes : colonies sèches et rugueuses des bacilles humains, colonies rondes et humides des bacilles bovins.

Les travaux de la Royal Commission anglaise distinguent les colonies eugoniques qui poussent bien sur milieux glycérinés, et les colonies dysgoniques qui poussent mal sur les mêmes milieux.

Ce sont BAERTHLEIN et TOJODA, en 1913, qui notent la présence de colonies distinctes sur leurs milieux.

PETROFF (1927-1930) distingue 4 variétés :

R sèches et rugueuses,
S lisses et arrondies,
FS (plat smooth) étalées et lisses,
Ch chromogènes.

Il fait les remarques, confirmées par JENSEN plus tard, sur les caractères des cultures des bacilles humains et bovins.

Les colonies de bacilles humains sont de type R, les colonies de type bovin sont S.

Il note, d'autre part, que le bacille bovin donne deux sortes de colonies :

S bombées, lisses, facilement émulsionnables,
R opaques, plates, qui se pigmentent et sont mal émulsionnables.

Les B.K. de la variété S sont très pathogènes pour le cobaye et le lapin et comportent deux antigènes ; les B.K. de la variété R sont peu pathogènes et ne comportent qu'un seul antigène.

JENSEN et FRIMODT-MOLLER pensent que la mutation de dysgoniques en eugoniques est irréversible, qu'il n'y a pas de différence de virulence. D'après eux, la dissociation serait due à une adaptation du germe à la glycérine et donnerait pour cela des colonies de type R et eugoniques.

Nous pouvons retenir de ceci que la dissociation du bacille tuberculeux est fonction de sa nutrition, mais que, contrairement aux autres germes, les caractères R et S ne sont pas liés à une notion de virulence, puisque tous deux sont virulents pour le cobaye dans ce cas.

Tout dernièrement s'est posé le problème délicat des B.K. isoniazido-résistants.

Au tout début de l'emploi de l'INH, on avait pensé que cette drogue agissait sur les B.K. en leur faisant perdre leurs affinités tinctoriales, car on en trouvait moins aux examens directs. Bien que ces faits aient été démontrés (école de Strasbourg), ils ne semblent plus poser de problème bien important. Par contre, de nombreux auteurs (et tout dernièrement encore, G. CANETTI et

J. GROSSET y ont insisté dans la Revue de la Tuberculose) ont trouvé des cultures poussant tardivement, et ceci de façon de plus en plus fréquente. Cette difficulté de pousse a été attribuée au développement d'une isoniazido-résistance. Ces faits et la découverte d'une virulence moindre pour le cobaye ont justifié la discussion du problème à la XIV[e] Conférence Internationale de la Tuberculose de la New-Delhi, en janvier 1957. Les auteurs ont été d'accord pour trouver que ce germe était particulièrement difficile à faire pousser et JOSEPH l'a même comparé au bacille de Hansen qu'on voit mais qu'on ne peut pas cultiver. Les réactions de catalases ne sont pas assez sensibles, même quand on les pratique à la WARBURG, quantitativement, car elles sont fonction de la jeunesse des cultures et de la proportion de colonies isoniazido-résistantes (RIST). TIRUNARAYANAN a proposé de remplacer la catalase par la péroxydase : on met en contact le bacille avec du catéchol en solution dans de l'eau oxygénée à pH 4.

Mais le problème essentiel, qui consiste à faire pousser plus vite ces bacilles, n'est pas encore résolu :

Les travaux de COLETSOS ne sont pas terminés et il n'a pu que signaler l'action de stimulation de l'acide pyruvique sur le bacille bovin à la concentration de 1.500 gammas par centimètre cube, en notant que les concentrations supérieures à 4.000 gammas sont inhibitrices.

Pour BOENICKE la catalase de MIDDLEBROOK n'améliore pas les milieux habituels. Pour lui, et après expérimentation, les meilleurs produits sont : l'hémine. le Fe-chlorophyllin et le Fe-phtalocyanin. L'hématoporphyrine et la chlorophyllin sans métal sont impropres. Ces corps agiraient par leurs péroxydases.

Nous devons donc considérer tous ces facteurs toutes les fois que nous voulons pratiquer un milieu de culture. Mais ceci ne doit cependant pas nous faire oublier les éléments indispensables pour la croissance du B. K. et une brève revue des connaissances actuelles sur la question semble indispensable.

## II - LES ELEMENTS DU METABOLISME BACILLAIRE

Le bacille de KOCH demande pour pousser un minimum d'éléments. Nous allons essayer de passer en revue les différents corps étudiés dans la littérature mondiale et voir quelles notions importantes peuvent en être dégagées.

Nous étudierons successivement le rôle du carbone, de l'azote, des oligo-éléments et de substances plus rares (diastases, vitamines et pH), en gardant pour la fin le problème de l'oxygène.

### a - Le carbone.

Dès 1887, NOCARD et ROUX démontrent l'importance de la glycérine.

FROUIN et GUILLAUMIE en 1926, obtiennent un maximum de cultures avec l'association : asparagine + sels minéraux à la concentration de 2 à 5 %

NOCARD, dès 1885, avait étudié les propriétés du sucre de canne.

HAMMERSCHLAG substitue à la glycérine des sucres de canne, de raisin, du glycogène et de la dextrine.

PROSKAUER et BECK (1894), SAUTON (1912), ARMAND-DELILLE, MAYER, SCHAEFFER et TERROINE échouent avec des sucres et des polyalcools variés : glucoses, lévulose, saccharose, rhamnose, mannose mannite, dulcite, maltose, glycol, érythrite, amidon soluble.

Pour DUBOS, l'élément de choix, supérieur même à la glycérine, est le glucose. Pour cet auteur, le fait a été méconnu parce que le glucose donne naissance à des substances toxiques quand on le chauffe en milieu alcalin ou même neutre. La seule façon de préparer le glucose est de le filtrer ou de le stériliser à l'autoclave sous forme de solution concentrée à 50 %, légèrement acidifiée par de l'acide citrique (1 % d'une solution normale).

Pour UYEI (1930), l'inosite, le maltose et le glucose stimulent le métabolisme. L'amidon soluble et la dextrine agissent sur la division cellulaire.

En ce qui nous concerne, le glucose ne nous a jamais paru supérieur à la glycérine. Toutefois, nous avons une

préférence marquée pour l'asparagine qui semble pouvoir être plus facilement stérilisée et qui présente l'avantage de ne pas être un corps gras et donc de mieux se mélanger aux différents milieux sans que sa dilution dans le milieu pose de problème.

Cependant, un élément récent est apparu dans les publications modernes : la glycérine aurait un pouvoir d'inhibition vis à vis des germes isoniazido-résistants. A. KREBS et W. KAPPLER signalaient récemment encore le fait, et la fréquence des cultures tardives pourrait bien y trouver sa raison d'être. Le récent Congrès de la New-Delhi n'a pas apporté de solution à ce problème.

**b - L'azote.**

Les protéines sont les grandes fournisseuses d'azote. Parmi celles-ci, les acides aminés simples sont les plus intéressants, le B. K. étant impuissant à dégrader les chaînes trop longues.

BOUVEAULT (1892) montre que la créatine et la créatinine favorisent la pousse, alors que la gélatine et la peptone ne sont pas utilisées.

KUHNE (1894) montre le rôle de la leucine, de la taurine, de l'asparagine.

PROSKAUER et BECK (1894) préfèrent l'alanine

ARMAND-DELILLE, MAYER, SCHAEFFER et TERROINE (1913) pensent que l'arginine et surtout le glycocolle sont les meilleurs fournisseurs.

LONG, en 1922, trouve que la leucine et l'histidine sont de bons fournisseurs et que le tryptophane, la phénylalanine, la tyrosine, l'urée, la créatinine sont impropres.

LOBSTEIN (1922) montre que l'azote minéral est peu utilisé, que le sulfate d'ammonium est un mauvais aliment et que les azotates sont toxiques.

DUBOS pense que la sérine et l'alanine inhiberaient plutôt les pousses et que le meilleur aliment serait l'acide glutamique à 0,3 %.

Quant à nous l'arginine nous a donné les meilleurs résultats. Toutefois, ces acides aminés ne donnent le meilleur d'eux-mêmes qu'associés à la glycérine, ce qui complique singulièrement la question à un moment où l'on songe à supprimer celle-ci...

**c - Les oligo-éléments, les diastases, les vitamines et le pH.**

Dès 1912, FROUIN insiste sur la nécessité d'adjoindre du phosphore, du potassium et du magnésium.

Depuis, CALMETTE et MASSOL y ont ajouté le fer, BEZANÇON et PHILIBERT, BROUDIN, SAUTON insistent sur le rôle du calcium et du manganèse.

Pour LOMINSKY (1933), le glycocholate de soude stimule en milieu liquide à doses faibles, et inhibe au contraire à doses fortes.

Le silicate de soude et l'acide silicique à 1 pour 10.000 favorisent la pousse sur DORSET.

SAUTON après CALMETTE et MASSOL confirme que le fer à la concentration de 1 pour 100.000 triple le poids de la récolte.

Mais pour CALMETTE, si le phosphate de potassium est eutrophique, le manganèse, le cuivre, le zinc et l'arsenic n'ont aucune action, et le calcium diminuerait même le rendement.

En fait le cuivre retarde le départ à dose très faible, il l'inhibe à concentration plus forte et en excès il diminue le rendement.

Ces notions sont assez vagues et toutes les recherches faites à ce jour dans ce sens n'ont pas apporté de nouveauté sensationnelle.

Le problème des diastases bacillaires est plus que jamais à l'ordre du jour et semble très complexe. Nul doute qu'il y ait un rapport entre la richesse des corps bacillaires en diastases et leur pouvoir de virulence mais les cultures sont mouvantes par définition et ces qualités ne sont pas immuables dans la race suivant l'âge, les conditions d'existence, etc...

Pour GORIS (1920), il n'y a dans le corps bacillaire ni oxydase ni peroxydase.

Pour HALM (1897) et LONG (1919), l'existence d'une catalase est indiscutable.

LOBSTEIN, en 1922, montre qu'il n'y a ni maltase, ni lactase, ni inulase, ni sucrase.

KENDALL, DAY et WALKER, en 1914, démontrent l'existence d'une esterase particulièrement intéressante puisqu'elle résiste 15 minutes à 100°.

CORPER et SWEANY, en 1918, montrent la présence d'une tryptase, d'une éreptase, d'un ferment pepsique et d'une nucléase.

DERNBY et NAESLUNG (1922) signalent la présence d'une endotryptase.

La présence d'une uréase est niée par LOBSTEIN et affirmée par CORPER et SWEANY.

Parmi les vitamines utiles, si le rôle des vitamines A et D a été nié par UYEI et MORITZ en 1928, UYEI a attribué entre 1927 et 1930 un rôle aux vitamines B et C. Ces travaux n'ont pas été confirmés en ce qui concerne la vitamine C, mais par contre LUTZ a montré que dans les vitamines B ce qui est actif c'est la pyrimidine et non le thiazol.

LONG, CAMPBELL et SMITH ont montré dès 1922 que le pH optimum se trouvait entre 6,4 et 7,8.

Reste à voir le problème épineux de l'oxygène.

**d - Le problème de l'oxygène.**

Le bacille de Koch est un aérobie non strict, puisque des cultures en profondeur sont possibles. Les besoins de ce germe en oxygène ont fait l'objet de très nombreux travaux dont nous allons essayer de faire une synthèse.

MOORE et WILLIAMS, en 1909, ADAM, en 1912, montrent que les cultures ralentissent considérablement quand la proportion d'oxygène dépasse 70 %. En oxygène pur, la culture tend à gagner en profondeur.

WEBB, BOISSEVAIN, RIDER, en 1924, montrent que la pousse cesse quand la concentration tombe au-dessous de 20 %.

MARIE et TIFFENAU (1912), FROUIN (1913) démontrent que l'acide carbonique entrave la pousse à doses fortes mais la favorise à doses très faibles.

WHERRY et ERVIN (1918) montrent que si la pression en gaz carbonique tombe en-dessous de 7,7 mm., le

B.K. ne se développe plus. La concentration maximum d'oxygène serait de 40 à 50 % dans l'air.

KEMPNER démontre que le métabolisme du B. K. atteint son maximum quand la concentration en oxygène du milieu est de 14 %, taux voisin de celui des alvéoles pulmonaires.

CORPER et LURIE montrent que le sang artériel est meilleur que le sang veineux, du moins quant à la tension en oxygène.

ANDREJEW démontre que les cultures jeunes résistent mieux au manque d'oxygène que les cultures anciennes, et, d'autres part, que les besoins en oxygène sont fonction des milieux, c'est-à-dire que le B. K. demandera des quantités différentes d'oxygène pour pousser normalement suivant les milieux sur lesquels il se trouve.

DREA, sur le milieu de DUBOS constate que l'oxygène diffusé au milieu suffit pour obtenir une culture satisfaisante à condition qu'il ne se forme pas de voile à la surface du milieu, voile qui absorberait au passage l'oxygène susceptible de diffuser au milieu. Une pellicule huileuse à la surface d'un milieu freine considérablement la pousse tout à la fois en quantité et en rapidité. Et, cependant, l'huile laisse diffuser un peu d'air (GRIKORAKY, Lyon 1946).

Adam BEKIERKUNST (1957) a imaginé un moyen simple pour obtenir des cultures dans un milieu saturé en gaz carbonique : grâce à des bougies allumées dans une enceinte portée à l'étuve. Il prétend obtenir 10,2 % de cultures positives de plus que par les moyens classiques.

Il est très difficile de se faire une opinion quand tant de faits s'opposent.

En fait, la lecture de ces différents travaux nous a incité à persévérer dans l'étude des milieux au sang, car ceux-ci nous ont semblé particulièrement bien convenir, même après connaissance de ces acquisitions.

# Les Techniques employées dans cette Étude

Les moindres différences de technique ont, au laboratoire, une importance capitale. Nous allons donc exposer les différentes techniques employées en essayant de les justifier, ou de justifier leur choix tout en nous réservant de décrire des techniques plus particulières au moment même de leur emploi.

Nous pensons que la culture commence au prélèvement des expectorations, et nous parlerons donc des différentes techniques de prélèvements, de façon sommaire d'ailleurs, et nous suivrons cette expectoration jusqu'à la lecture des cultures, en nous étendant un peu sur la préparation du milieu gélose au sang.

## A - LE PRELEVEMENT DES EXPECTORATIONS

Nous allons régler rapidement le problème des crachats qui ne soulève aucune difficulté.

Les crachats seront prélevés le matin au réveil, ceux-ci étant plus riches en bacilles à ce moment de la journée qu'à aucun autre. Le malade devra cracher dans un récipient stérile ne contenant aucun antiseptique et correctement fermé. Il arrivera que certains malades auront des bacilloscopies négatives malgré ces précautions, cela pourra provenir de deux causes principales : soit que le malade expectore peu de bacilles (tuberculose fermée, ou même

ouverte mais en période abacillaire), soit que le malade mette dans le crachoir de la salive pure ou des crachats de la veille au soir. Dans tous ces cas, il faudra approfondir les méthodes de recherche, et, alors, plusieurs possibilités s'offrent à nous : soit le tubage gastrique, soit l'expectoration mécaniquement provoquée, soit extraction instrumentale. Nous allons étudier ces différentes méthodes.

**a - Tubage gastrique.**

De nombreuses méthodes de tubages gastriques ont été proposées. Nous ne jugeons pas utile de pratiquer de grands lavages d'estomac au tube de FAUCHER, ces grands lavages sont traumatisants pour le malade surtout quand on doit les pratiquer en séries. Nous n'apprécions pas beaucoup non plus les tubages-perfusions selon la technique de MEYER, de SEYSSUEL, quoique leur pratique soit plus simple et donne aussi de bons résultats, parce que trop longs. Nous avons écarté aussi les tubages-lavages à l'aide d'un « décapant » (tel le dakin, proposé par CIAUDO) car les malades arrivent à ne plus pouvoir supporter l'odeur de Javel qui persiste après cette manœuvre.

Pour notre étude, nous avons pratiqué les tubages à l'aide d'une sonde assez rigide, d'un diamètre extérieur n'excédant jamais 6 à 7 millimètres, et pourvue d'orifices latéraux et à son extrémité, ces orifices étant d'un diamètres jamais inférieur à 3mm. Le lavage est pratiqué à l'aide de sérum physiologique en quantité variant de 50 à 100 cc, poussé à la seringue et aspiré de même. Le lavage n'est pratiqué que si la simple aspiration ne ramène aucune sécrétion. Le liquide gastrique ainsi obtenu est alors placé dans un récipient stérile et immédiatement expédié au laboratoire.

Il va sans dire que ces tubages seront pratiqués le matin, au réveil du malade, avant que celui-ci ne se soit levé, et avant toute ingestion d'aliment, en évitant même de boire. La meilleure technique dans ce cas consiste à faire des tubages répétés plusieurs jours de suite, mais avec un examen chaque jour, et non, comme le préconisait TISON, en groupant les prélèvements de 4 à 6 jours et en faisant une homogénéisation collective ce qui risque de diluer les bacilles, si le malade n'en crache qu'un jour sur cinq, par exemple.

**b - Expectoration mécaniquement provoquée.**

Nous allons grouper sous ce terme des manœuvres un peu différentes dans leurs moyens d'action mais identiques dans l'idée qui les dirige.

La technique consiste, chez un malade qui ne crache pas, à créer une expectoration artificiellement en nébulisant dans ses grosses bronches et sa trachée un produit qui sera soit un vecteur, soit un fluidifiant plus énergique. Nous avons délibérément écarté les fluidifiants pour nous consacrer aux aérosols de sérums physiologiques. Le malade ne crachant pas subit une séance d'aérosol de 15 à 30 minutes environ qui nébulise dans ses voies aériennes supérieures une petite quantité de sérum physiologique (10 à 20 cc.). On recueille ensuite les expectorations qui se produisent les deux ou trois jours suivants qu'on examine comme des crachats ordinaires. Cette méthode est très intéressante, car bien supportée par les malades et donne d'excellents résultats, en particulier chez les malades âgés ou timorés.

**c - Les manœuvres instrumentales.**

Nous rangerons sous ce terme générique toutes les manœuvres qui ont pour but de ramener les expectorations à l'aide d'un instrument quelconque.

La plus simple de ces manœuvres est l'écouvillonnage pharyngé ou laryngé. L'écouvillonnage pharyngé consiste à l'aide d'un porte-coton à aller prélever des sécrétions dans le pharynx et sur les amygdales (ce dernier procédé étant très inférieur au précédent). P. LOWYS préfère l'écouvillonnage laryngé suivant sa méthode personnelle qui consiste à réveiller un réflexe tussigène en portant un écouvillon stérile à travers les cordes vocales au miroir laryngé. Ce réflexe ramène des crachats qui sont alors prélevés à l'anse et avec lesquels on fait un étalement et une homogénéïsation après dissolution dans le sérum physiologique. Ces méthodes donneraient des résultats semblables à ceux du tubage gastrique et seraient tout spécialement destinées aux enfants. Quant à nous, elles nous ont semblées bien traumatisantes et bien inutiles.

Une deuxième manœuvre est possible dans certains cas bien particuliers : c'est la broncho-aspiration pendant une bronchoscopie ou à la sonde. Cette manœuvre est

certes très intéressante mais les indications de la bronchoscopie en limitent l'emploi, quant à aller mettre une sonde dans la trachée d'un tuberculeux, ce n'est pas sans danger, donc nous ne l'employons pas.

Nous ne citerons que pour mémoire les lavages bronchiques, qui laissent au malade un si mauvais souvenir quand ça n'est pas une aggravation sérieuse de son état...

En conclusion, le matériel sur lequel nous avons tra vaillé provenait :

— soit de crachats purs,

— soit de liquide gastrique obtenu par la méthode décrite,

— rarement d'aérosols de sérum physiologique,

— exceptionnellement de broncho-aspiration.

## B - HOMOGENEISATION ET PREPARATION DU CULOT

Ces expectorations parviennent au laboratoire dans la matinée, enfermées dans des flacons stériles que le personnel s'est procuré auprès de nous la veille.

Immédiatement, elles sont traitées en vue d'une homogénéïsation et d'une centrifugation.

Les procédés d'homogénéïsation sont très nombreux, et tous sont de valeur à peu près comparable. Depuis BEZANÇON et PHILIBERT, les méthodes se sont multipliées et toutes sortes de produits ont été utilisés pour fluidifier les expectorations : dakin, antiformine, divers sucres, hyaluronidase, pepsine, etc... Seules semblent présenter un intérêt les méthodes à la soude et les méthodes au Teepol (TISON).

La méthode, ou plutôt les méthodes, à la soude sont les plus pratiquées de nos jours. E BERNARD et B. KREISS pensent que cette méthode est la meilleure quelle

que soit la durée du contact avec les bacilles. Cependant, il résulte des travaux de GRAY, CLARKE et JOHNSTONE (1954) que si la soude est bien l'agent le moins toxique pour le B. K., sa durée d'action ne doit pas dépasser 30 minutes. TISON avait employé cette technique, mais les avantages du Tepol, vanté par de nombreux auteurs et en particulier par les Anglais P. BROWNING, K. M. CALVER et E. E. PATERSONN, lui sont apparus rapidement et il a alors mis au point une nouvelle technique combinant les avantages de la soude et ceux du teepol. Il obtiendrait les meilleures résultats par ce moyen .

Citons la technique récente de P. AMBERT et R. CAPET qui font agir la pepsine à 37° puis la soude et qui prétendent obtenir des résultats bien supérieurs et bien plus rapides.

Dans cette étude, nous avons employé la technique classique à la soude : dans un récipient stérile nous mélangeons le crachat ou le liquide gastrique à un volume égal de lessive de soude à 4 %. Nous portons alors en étuve à 37° pendant 2 à 3 heures. L'homogénéïsation est alors parfaite. Nous ajoutons 5 % d'alcool à 50° et nous centrifugeons pendant 20 minutes à 3.500 tours minutes dans des récipients stériles. Puis le culot est débarrassé du liquide surnageant et allongé jusqu'au volume nécessaire avec de l'eau distillée ou du sérum physiologique stérile.

Il est inutile de faire tourner la centrifugeuse plus rapidement et pendant plus longtemps, les résultats ne sont pas supérieurs et on risque de léser les corps bacillaires déjà maltraités par la soude.

TISON insiste beaucoup sur la neutralisation du culot par l'acide sulfurique en présence de pourpre de bromocrésol. Nous ne pensons pas que ce procédé présente un réel avantage, et nous avons même augmenté nos souillures de façon importante par ce système. Les travaux qui suivent s'entendent donc avec un culot non neutralisé

## C - LA FABRICATION DU MILIEU

Le milieu sur lequel porteront nos travaux est le milieu décrit par TARSHIS et ses collaborateurs. Au cours des travaux, diverses modifications ont été tentées et expérimentées, et nous essayerons d'en donner les résultats, mais ces expériences n'interviennent pas dans le travail statistique présenté.

Le milieux de TARSHIS est une gélose au sang découlant immédiatement des travaux de BEZANÇON et GRIFFON, et qui répond à la formule brute suivante :

| | | |
|---|---|---|
| Gélose poudre ..... | 1,5 | g |
| Glycérine ..... | 1 | g |
| Eau distillée ..... | 74 | cc |
| Sang humain ..... | 25 | cc |
| Pénicilline ..... | 50 | unités par centimètre cube de milieu. |

Le milieu de TARSHIS se prépare de la façon suivante : on prépare d'abord une eau glycérinée à laquelle on ajoutera la gélose. Il faut bien agiter la solution pour qu'elle ne fasse aucun grumaux et soit bien homogène, ce qui est rapidement fait. Ces opérations peuvent se pratiquer à l'air libre, car on porte maintenant la solution à l'autoclave. On fera stériliser cette solution en la laissant pendant 10 à 15 minutes à 120°. On laissera ensuite refroidir.

Pendant ce temps, on prépare un répicient stérile dans lequel on verse le sang et la pénicilline stérilement.

Le sang est un sang humain citraté, hémolysé, qu'il est facile de se procurer auprès des Centres de Transfusion. En effet, il arrive assez souvent que, lors d'un prélèvement, même correctement effectué, le sang hémolyse spontanément dans les flacons. On aura donc toute facilité pour se procurer ce sang, puisqu'il ne peut plus rendre aucun service aux Centres. On pourra ainsi se procurer un matériel de tout premier ordre, constitué par du sang de très grande fraîcheur, ce qui est un avantage indéniable.

Quand on peut sortir l'eau gélosée glycérinée de l'autoclave, on la porte dans un bain-marie à 45°, en prenant bien soin que tout le liquide soit immergé, pour que la gélose ne refroidisse pas prématurément. Quand

l'eau est à 45°, on verse la solution sang + Pénicilline, et il ne reste plus qu'à couler en tubes stériles. On utilisera de préférence, pour cela, des tubes de 16 ou de 18, qui nous ont donné toutes satisfactions, à raison de 5 centimètres cube par tube. On incline sur un portoir et on laisse coaguler, ce qui est, en général, très rapide. Le pH du milieu ainsi confectionné est de 6,8.

Les tubes seront laissés non encapuchonnés et inclinés à la température du laboratoire, pendant 3 jours, au bout desquels on jettera les tubes souillés, s'il y en a, et on pourra alors capuchonner les tubes et les ranger droits, en chambre froide à + 4°, où ils se conserveront très longtemps.

Il est très facile d'obtenir des tubes de milieu impeccables en suivant scrupuleusement la technique indiquée. En effet, nous verrons, plus loin, que le fait de s'en écarter légèrement grève fortement l'avenir du milieu.

Quoi qu'il en soit, la préparation est très simple et la fabrication d'une centaine de tubes demande à peine un peu plus de deux heures à une seule personne bien entraînée.

## D - LA MISE EN CULTURE PROPREMENT DITE ET LA LECTURE DES RESULTATS

La mise en culture est une manœuvre très simple et qui ne doit pas donner lieu à souillures si elle est faite rapidement.

Les tubes de milieu sont sortis de la chambre froide quelques heures avant l'ensemencement et laissés à la température du laboratoire.

Le culot de centrifugation allongé d'eau distillée ou de sérum physiologique jusqu'à un volume de deux centimètres cubes environ est ensuite distribué dans les tubes à raison de quatre à cinq gouttes par tube. L'opération se fait à la pipette Pasteur et avec celle-ci on fait un petit massage à la surface du milieu comme l'indique TISON.

Nos milieux ont été testés avant l'emploi, pour voir si les séries étaient bonnes, à l'aide de la souche H 37 Rv, aimablement communiquée par TISON à l'un de nous. Cette souche présente l'avantage de pousser en 4 à 6 jours.

Nous n'avons ensemencé pour cette étude que des produits pathologiques, et jamais de culture. Ces produits etaient testés auparavant pour connaître leur teneur en bacilles. Deux séries d'études ont été menées : une série de tubes n'a été ensemencée qu'avec des produits pathologiques richement bacillifères, dans le but d'étudier la rapidité de pousse pure. Une deuxième série a été ensemencée de concert avec nos examens de routine et, de ce fait, a reçu des ensemencements dont la richesse bacillaire était inconnue, dans le but de rechercher la fidélité du milieu.

Nous avons, en général, ensemencé 6 tubes : 2 tubes de milieu de TARSHIS, et 4 tubes de milieu de LOEWENSTEIN de l'Institut Pasteur de Paris, ces tubes étant de dates de fabrication différentes pour éviter les séries qui auraient pu se détériorer.

Après ensemencement, les tubes ont été mis en étuve à 37° sur des portoirs en position inclinée, pendant 48 heures. Au bout de ce laps de temps, ils ont été capuchonnés, mais nous les avons laissés inclinés, car nous pensons qu'ainsi nous pouvons éviter le dessèchement trop rapide des milieux.

Les lectures ont été pratiquées tous les cinq jours, jusqu'au 15e jour, puis tous les trois jours ensuite, en évitant de laisser les tubes trop longtemps hors de l'étuve.

# Les Résultats

Dans ce chapitre consacré à l'étude des résultats de nos travaux, nous avons divisé le compte rendu en trois paragraphes, qui seront : les principaux aspects des cultures sur milieu au sang, comment les distinguer d'autres colonies, de souillures, par exemple ; la deuxième partie sera consacrée à l'étude de la rapidité de pousse comparée sur milieu de TARSHIS et sur milieu de LOEWENTEIN. Un troisième chapitre, enfin, sera consacré à l'étude de la richesse respective des deux milieux en colonies bacillaires.

## A - LES DIFFERENTS ASPECTS DES COLONIES SUR MILIEU AU SANG

Une des plus grandes difficultés qui attendent le néophyte de ces milieux, est l'aspect des colonies bacillaires. En effet, l'habitude de rechercher des colonies crèmes sur fond vert clair fait que l'on est un petit peu désorienté quand on regarde pour la première fois ce milieu rouge très foncé. Il est important de bien avoir l'aspect de la colonie type dans l'œil, car l'allure générale des ensemencements peut bien souvent prêter à confusion, surtout au début. Il faudra donc, pour dire qu'une colonie a poussé, attendre l'apparition de colonies typiques et suffisamment grosses pour être appréciées microscopiquement

avec un minimum d'erreur. De toute façon, une vérification microscopique a toujours été pratiquée et est toujours souhaitable.

On peut distinguer deux catégories de colonies, suivant leur taille : des micro et des macrocolonies.

**a) Les microcolonies.**

Représentent environ 40 % du total.

Ce sont des colonies très petites, dont le volume atteint environ celui de la tête d'une épingle, soit au maximum 15/10e de millimètre de diamètre. Ces colonies sont, dans la presque totalité des cas, très nombreuses et recouvrent souvent la totalité du milieu. Il semble que ces aspects correspondent, dans la majorité des cas, à des ensemencements très riches en bacilles. Ceci expliquant cela, il n'y aura donc rien d'étonnant à ce que ces colonies soient, en général, des colonies de pousse rapide mais dont le développement stoppe aussi rapidement.

Ces colonies ne sont pas toutes de même couleur. Il semble, d'ailleurs, que la polychromie soit une règle dans les milieux au sang, et bien souvent on peut voir des colonies de couleurs différentes pousser sur un même tube. Les colonies peuvent aussi être de taille différente, sans que la variété du germe soit en cause.

La coloration des différentes colonies varie du brun clair au brun foncé, en passant par un brun rouge d'un très heureux effet, mais difficile à distinguer du milieu. Il semble que la coloration d'ensemble soit fonction de la vieillesse du milieu et surtout de l'âge du sang utilisé En effet, les colonies les plus foncées semblent pousser sur les milieux les plus récents et dont le sang est le plus frais. Au contraire, les tubes de milieu confectionné avec du sang datant de plus de quinze jours ou employés trop tard donnent des colonies plus souvent claires.

**b) Les macrocolonies.**

Sont les plus fréquentes (60 %), peut-être parce qu'elles semblent correspondre à des ensemencements pauci-

bacillaires (relativement d'ailleurs), et que ceux-ci sont quand même plus fréquents.

Les bacilles de Koch se présentent, dans ce cas, sous forme de colonies peu nombreuses (de une à dix par tube), très nettement séparées les unes des autres, fortement rugueuses, alors que les microcolonies sont plus lisses. Ces colonies débutent comme les précédentes, mais avec une coloration presque toujours claire, et prennent rapidement, en huit à dix jours, leur taille définitive. Elles sont un peu plus lentes à pousser et présentent des variétés tinctoriales plus grandes que les microcolonies. En effet, on trouvera, dans ce cas, des colonies volumineuses, d'une surface d'un centimètre carré et d'une hauteur pouvant atteindre 3 à 4 millimètres, ressemblant fortement aux colonies obtenues sur LOEWENSTEIN, c'est-à-dire crèmes et très rugueuses, mais on pourra aussi voir des colonies beaucoup plus foncées, allant jusqu'au marron foncé, et même des colonies vertes, d'un vert franc, et correspondant à des bacilles acido-résistants indiscutables. Cependant, dans la majorité des cas, on retrouvera ici les mêmes teintes que sur les milieux classiques. Nous avons pourtant obtenu la pousse, sur un même tube, de colonies brun clair typiques et de colonies vert foncé. Nous n'avons trouvé aucune explication à ce phénomène, à moins qu'il ne s'agisse d'un chromogène ?

Le vieillissement des tubes de culture ou du sang ne semble pas être ici en rapport avec la coloration des différentes colonies.

**c) Conclusion.**

Ces deux types de colonies très différents et les déductions qu'on a pu tirer de la richesse de l'ensemencement sembleraient montrer que les bacilles ne trouvent pas dans ce milieu des éléments nutritifs suffisants pour assurer une croissance importante. Tout se passe comme si les microcolonies, par leur nombre, épuisaient le milieu avant d'avoir atteint leur développement maximum, et comme si les macrocolonies, au contraire, peu nombreuses, atteignaient un développement plus grand, du fait du peu de concurrence vitale.

## B - LES DELAIS DE POUSSE COMPARES

Nous avons ensemencé pour cette étude 612 tubes correspondant à 97 malades différents : 384 tubes de milieu de LOEWENTEIN et 228 tubes de milieu de TARSHIS. Nous avons obtenu 284 tubes positifs, appartenant à 52 malades différents, soient 158 tubes de milieu de LOEWENSTEIN et 126 tubes de milieu de TARSHIS. Le pourcentage de tubes positifs est assez élevé car, en effet, non seulement le service de pneumologie de notre maître, M. le professeur MATTEI, comprend un nombre important de tuberculoses ouvertes, mais encore nous avons ensemencé des expectorations notoirement bacillifères, soit dans le but d'étudier leur résistance aux antibiotiques, soit dans un but purement spéculatif. Il ne faut donc accorder à ce pourcentage que la valeur d'une indication sur l'importance du travail exécuté.

Nous avons étudié ces délais de pousse en tenant compte de deux facteurs : d'une part, le fait qu'on n'indique, en général, que le délai de pousse du premier tube à se positiver, d'autre part, le nombre de tubes qui se positivent dans chaque série, quelle qu'en soit la date. En effet, il est assez fréquent de voir les tubes d'une même série pousser à des intervalles de temps quelconques, surtout quand il s'agit de tubes de dates de fabrication différentes. Nous verrons, dans le paragraphe suivant, que si cette notion n'a que peu d'importance pour le diagnostic, elle prend toute sa valeur quand il s'agit de pratiquer des épreuves de résistance aux antibiotiques où le poids total de la récolte joue un grand rôle.

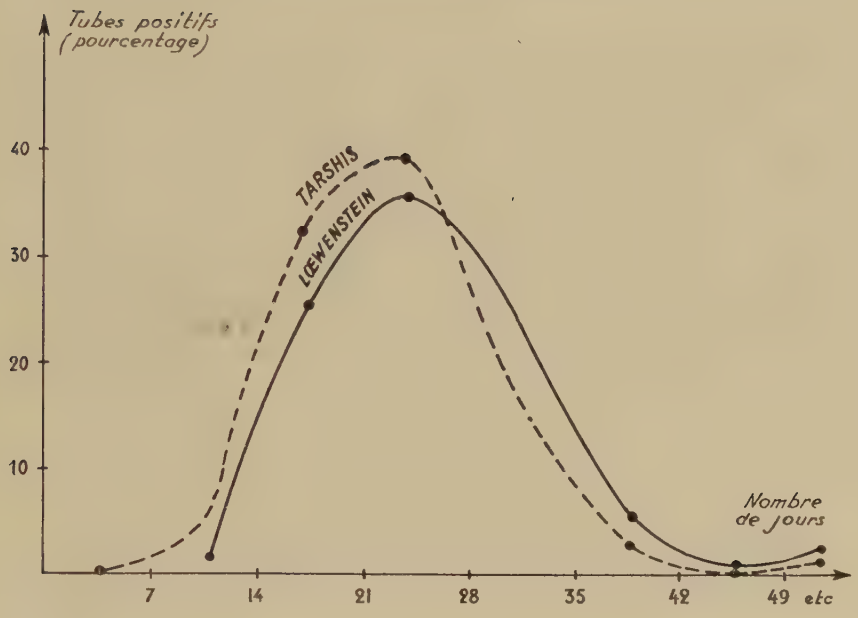
Nous avons essayé de représenter graphiquement ces résultats. en les exprimant le plus souvent possible en pourcentages, plus commodes pour la bonne compréhension du dessin.

Dans une première courbe, nous avons représenté le pourcentage de tubes positifs en fonction du temps. Ce pourcentage est exprimé en ne tenant compte que du premier tube positif dans chaque série.

L'étude du graphique et du tableau qui l'accompagne montre la fréquence des pousses au courant des semaines.

Nous voyons ainsi clairement que, dans notre série, les tubes de LOEWENSTEIN se sont positivés, en général, entre le dix-huitième et le trentième jour, avec un maximum au vingt-cinquième jour. Peu nous importe de

## Délais de Positivation




POURCENTAGES :

| | 1re semaine | 2e semaine | 3e semaine | 4e semaine | 5e semaine | 6e semaine | 7e semaine | 8e semaine |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lœwenstein | | 3 | 25 | 36 | 23 | 7 | 2 | 4 |
| Tarshis | 1 | 6 | 31 | 39 | 16 | 4 | 1 | 2 |

Pour l'établissement de cette courbe, on n'a tenu compte que du délai de pousse du *premier* tube positivé de chaque série.

savoir ici si ces délais sont normaux ou trop longs : la chose importante est de savoir comment s'est comporté le milieu de TARSHIS dans des conditions strictement identiques.

La courbe nous apprend que les tubes de TARSHIS ont vu leur maximum de pousse se produire du quatorzième au vingt-huitième jour, avec une acmée au vingt-quatrième jour.

Quelles conclusions tirer de cette première observation ? Il semble que le milieu de TARSHIS donne des cultures plus rapidement que le milieu de LOEWENSTEIN. Ceci n'apparaît pas très nettement dans le schéma, mais à l'examen des chiffres donnés dans le tableau qui l'accompagne, on se rend compte que le nombre total de tubes positifs avant la quatrième semaine s'élève à 77 % pour le milieu au sang, alors qu'il ne s'élève qu'à 64 % pour le milieu classique. Cette différence, quoique peu importante, nous permet de dire que ce milieu donne des résultats peu avant le milieu de LOEWENSTEIN, mais en plus grand nombre, ce qui intéresse le biologiste.

Ces courbes doivent encore attirer quelques réflexions de notre part.

En effet, si on considère ses extrémités : les pousses très précoces, si elles sont une source d'erreur, valent quand même qu'on les étudie ; quant aux pousses tardives, elles sont trop à la mode pour que nous nous attardions sur leur intérêt. Nous allons donc essayer d'expliquer ces faits.

Nous avons obtenu un tube de milieu de TARSHIS qui a poussé en six jours. Après vérification, il s'agissait bien d'un germe acido-alcoolo-résistant, mais nous n'avons pu tester sa virulence ni le classer dans une variété. Nous l'avons conservé dans la statistique, mais avec toutes réserves sur sa nature. Ajoutons cependant que les autres tubes de sa série ont donné des colonies d'aspect normal au bout du délai, normal lui aussi, de quatorze jours.

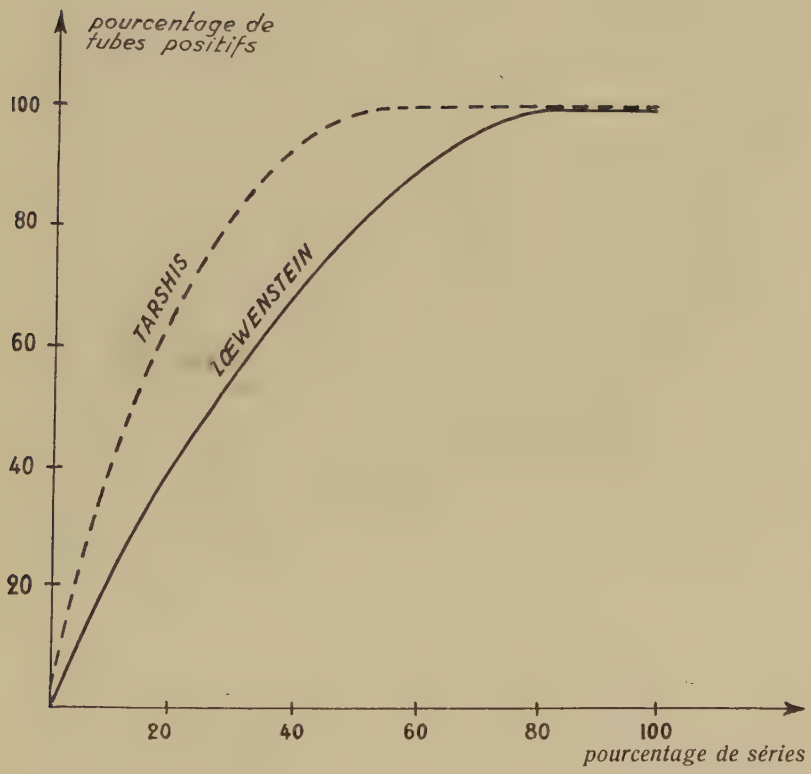
Plus intéressant est le fait que nous ayons obtenu sept tubes positifs sur TARSHIS, du dixième au douzième jour, quand, dans le même temps, nous n'en obtenions que cinq sur LOEWENSTEIN, soit un pourcentage moitié moindre. Il nous a semblé, en effet, que le fait de donner de temps en temps des colonies particulièrement précoces était une autre caractéristique du milieu au sang. Ceci est extrêmement important et présente surtout un intérêt pour des malades à l'expectoration riche en bacilles et

pour lesquels on veut pratiquer une résistance aux antibiotiques.

La fin de la courbe, elle, concerne les bacilles à culture lente. Cette question est à la mode et d'aucuns ont voulu voir dans cette pousse retardée une manifestation d'isoniazido-résitance (G. CANETTI et J. GROSSET, RIST). Disons de suite que nous ne sommes pas de cet avis et que nous rejoignons sur ce sujet les conclusions de TISON. Mais ce problème est, pour nous, secondaire et il nous a paru, par contre, très intéressant de constater que nous obtenions les pourcentages importants de 4 % de cultures âpres le cinquantième jour sur LOEWENTEIN (dont deux le quatre-vingt-unième jour), et 2 % seulement sur TARSHIS (la plus tardive du cinquante-quatrième jour). Ceci nous a semblé rejoindre les opinions de DIONNE et de TARSHIS lui-même qui prétendent qu'il est inutile d'espérer une culture d'un tube stérile au bout de deux mois, alors qu'il est classique d'attendre la fin du troisième mois pour les milieux usuels.

La deuxième courbe répond à une observation dont on appréciera l'importance à la fin du paragraphe suivant. Nous avons, en effet remarqué que les deux tubes de milieu de TARSHIS étaient souvent positifs tous les deux, alors que nos quatre tubes de LOEWENSTEIN ne présentaient souvent de colonie que sur un ou deux seulement des tubes. Nous avons donc ensemencé des expectorations sur plusieurs tubes de chaque milieu (en principe, quatre à six de chaque). Nous avons ainsi pu constater que le B.K. se développait avec beaucoup plus de régularité sur le milieu au sang que sur le milieu à l'œuf. Ceci a justifié l'établissement de notre courbe.

Celle-ci nous montre, en effet, que si, comme nous le verrons par ailleurs, les tubes de LOEWENSTEIN sont, en général, porteurs de colonies plus importantes que les géloses au sang, celles-ci sont beaucoup plus régulièrement positives dans la totalité des tubes de chaque série. Nous pouvons voir que, dans 24 % des cas, tous les milieux à l'œuf de la série correspondante sont positifs, et dans 52 % des cas les géloses au sang sont totalement positives. Ceci veut dire que la récolte totale de germes suivant l'un ou l'autre procédé, s'équivaut. Notons, au passage, que les colonies sur milieu au sang ne sont pas adhérentes du tout, ce qui permet de prendre des colonies à peu près pures, alors que les colonies sur milieu à l'œuf sont très adhérentes et que leur prélèvement entraîne bien souvent, soit le prélèvement d'un peu de milieu, soit le prélèvement incomplet des colonies.




## Nombre de Tubes positifs par série

Dans l'élaboration de ces courbes n'entrent que les séries positives sur les 2 milieux. Le graphique montre nettement que les séries de milieux de Tarshis sont plus fréquemment (52 %) positives entièrement que les séries de milieux de Lœweinstein (24 %).

## C - RICHESSE RESPECTIVE DES DEUX MILIEUX EN COLONIES BACILLAIRES

Il nous a semblé utile de faire ce chapitre concernant, en somme, le rendement des deux milieux car, si on trouve régulièrement la mention du poids de culture obtenu dans les milieux du début du siecle, cette notion n'est plus guère traitée par les auteurs modernes. Or, celle-ci a subi, dans les dernières années, une impulsion subite, du fait de l'apparition des antibiotiques et de la nécessité dans laquelle se sont trouvés les biologistes de pratiquer des mesures de résistances. Ces résistances se font de façon très simple, en mettant une suspension de bacilles obtenus par culture sur un milieu imprégné de substance antibiotique en quantité croissante. Mais encore faut-il que cette suspension soit assez dense pour donner une pousse appréciable et, pour cela, TISON a donné une règle simple : il faut faire une suspension telle que l'on ne puisse pas lire ce qui est écrit sur un papier placé derrière elle. Ceci représente une quantité de bacilles assez importance (de l'ordre de quelques centigrammes, suivant le nombre de tubes à ensemencer). Or, dès nos premiers résultats, il nous est apparu que le milieu de TARSHIS ne donnait pas de pousse suffisamment riche pour nous permettre ce geste, ce qui pouvait présenter un inconvénient sérieux à son emploi systématique.

Nous avons donc décidé de faire une étude comparative de la richesse en colonies des deux milieux.

Les résultats que nous avons obtenus ont été, comme dans le travail précédent, inscrits sous forme de courbes plus agréables et plus faciles à lire qu'un compte rendu aussi succinct et aussi précis qu'il soit.

Dans cette courbe, nous n'avons pas tenu compte de la taille des colonies, considérant que cela ne ferait qu'un avantage de plus pour le milieu de LOEWENSTEIN, et nous allons voir qu'il n'en a pas tellement besoin .

Nous avons exprimé le nombre de tubes là encore par des pourcentages, plus faciles à interpréter sans avoir à faire une petite opération mentale. Nous avons d'autre part exprimé le nombre de colonies en unités par centimètre carré en admettant qu'à partir de cinquante colonies par unité de surface, celles-ci devenaient incomptables.

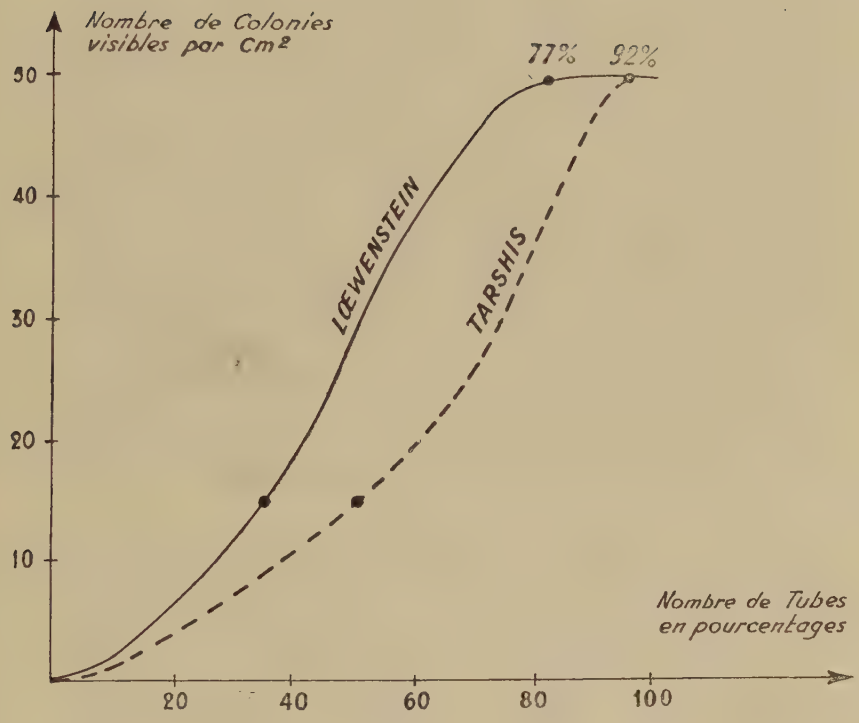
Si nous considérons le graphique maintenant défini, nous constatons que dans 23 % des cas, le milieu de LOEWENSTEIN présente des colonies en nombre incomptable, à tel point que le milieu est recouvert par une nappe crémeuse ,épaisse, remontant même le long des parois du tube. Dans 34 % seulement des cas, le milieu présente moins de quinze colonies par centimètre carré.

Le milieu de TARSHIS, au contraire, est beaucoup plus pauvre. On peut considérer que les colonies sont incomptables dans 8 % seulement des cas, et l'on compte moins de quinze colonies par centimètre carré dans 50 % des cas.

Si l'on considère que les conditions d'observation : lecture après trois mois de pousse en étuve, sont plutôt favorables au milieu au sang, on constatera aisément une nette supériorité de rendement au profit du milieu à l'œuf. Il faut toutefois tenir compte du fait que les colonies sur milieu de TARSHIS s'agglomèrent moins facilement que sur LOEWENSTEIN, ce qui explique en partie les différences en haut du graphique. Il n'en reste pas moins indéniable que le milieu au sang a un rendement infiniment moindre. C'est ici que le travail entrepris dans le paragraphe précédent prend toute sa valeur : en effet, si les tubes de gélose au sang sont moins riches individuellement, le fait qu'ils se positivent en plus grand nombre permet de pallier en partie à ce défaut et de faire des suspensions suffisamment riches pour servir à des épreuves de résistances.

## REMARQUES GENERALES

Les résultats dissociés ont été particulièrement rares dans ce travail : dans quatre cas seulement, nous avons obtenu des cultures sur l'un ou l'autre milieu isolément. Dans un cas, nous avons eu une culture positive sur milieu de LOEWENSTEIN, et dans trois cas, nous avons eu une culture sur milieu de TARSHIS uniquement. Et ceci, en ne tenant compte que des expectorations ensemencées directement sans savoir quelle était leur richesse en bacilles. Ces résultats n'ont aucune valeur statistique et ne peuvent en aucun cas permettre de donner la préférence à l'un ou à l'autre milieu.




## Richesse respective des Milieux

On voit par ces courbes (où 50 colonies par cm² sont considérées comme incomptables) que le milieu de Tarshis est en général beaucoup moins riche en colonies bacillaires que le milieu de Lœwenstein.

Les souillures ont été un sujet de craintes et d'inquiétude pour nous, pendant tout notre travail. Le souvenir des premières géloses au sang nous poursuivait. En fait, le milieu en lui-même, s'il y est accessible, peut-être plus qu'aucun autre, ne pose pas de problème bien particulier : en effet, les souillures, si elles sont dues aux manipulations lors de la préparation du milieu se développent en général avant le troisième jour, jour de capuchonnage. Toutefois, pour plus de sécurité, on pourra laisser les tubes trois jours en étuve après les avoir capuchonnés. Les souillures qui sont en général des mycoses du genre « mucor » ou « aspergillus », donc à développement rapide, seront alors visibles. Les souillures apportées par les manipulations lors de l'ensemencement sont cependant plus fréquentes qu'avec les milieux à l'œuf ; nous en avons dénombré lors de ce travail quatorze tubes, soit un peu plus de 2 %, à peu près le double de celles rencontrées sur milieu de LOEWENSTEIN. Mais, du fait de la multiplicité des tubes ensemencés, nous n'avons eu que rarement des séries complètement souillées : deux séries seulement, dont une a souillé tous les tubes de quelque nature qu'ils soient, ce qui laisse à penser que la souillure avait son origine soit dans les flacons ayant contenu l'expectoration, soit dans la mauvaise désinfection des parasites par la soude.

Depuis les travaux initiaux de TARSHIS les publications de différents auteurs ont permis de préciser certains points ayant trait à la composition du milieu. Certains ont en effet éprouvé comme nous des difficultés avec la glycérine et l'ont remplacé par de l'asparagine à la dose de 0,3 %, ce que nous conseillons, car le milieu ne peut que profiter de cette amélioration. D'autres, et en particulier LO MONACO, ont critiqué la pénicilline : si on met des quantités trop fortes le milieu perd de sa sensibilité et ceci pour des quantités peu supérieures à celles employées. Ceci rejoint les travaux de TARSHIS. Il est conseillé de remplacer cet antibiotique par du vert malachite. LO MONACO signale en outre que l'association des deux produits entraîne une perte totale de la sensibilité du milieu, que par ailleurs il considère comme très bon. Il précise ensuite que l'aspect des cultures permet de vérifier la nature humaine ou bovine des bacilles. Il indique que les sangs de cobaye, de mouton et de lapin sont impropres à la fabrication du milieu.

Nous voyons donc que ce milieu est un des meilleurs qui se puisse faire en ce moment avec du sang.

Nous devons toutefois signaler que nous nous servons

actuellement d'un milieu très simple dont les résultats sont encore à l'étude. Ce milieu est confectionné de la façon suivante : on mélange dans un récipient stérile du sang humain citraté, hémolysé, de Centre de Transfusion, à une partie égale de sérum de cheval stérile (Hemostyl). Ce mélange, stérile, est ensuite coulé dans des tubes de 18 à raison de 5 centimètres cubes par tube et placé dans un coagulateur à raison de trente minutes à 70° le premier jour et de quinze minutes à 65° les 2 jours suivants, le coagulateur étant chaud à l'introduction des tubes. Ce milieu n'a jamais été souillé lors de sa fabrication (tous les éléments en sont stériles), et ne semble pas se souiller par la suite. Il semble très intéressant pour le repiquage, mais il est encore à l'étude comme milieu de diagnostic.

# Cultures de Bacilles Streptomycino-Résistants sur le Sang des Malades eux-mêmes en présence de l'Antibiotique

Les mesures de résistances aux antibiotiques pour intéressantes qu'elles soient par les résultats qu'elles donnent ne peuvent pas être admises sans réserves étant donné le nombre assez élevé de résultats qui ne correspondent pas à la réalité clinique.

Ceci est en partie expliqué par le fait que le B. K. de culture est un monstre, et que les épreuves de résistances sont exécutées sur ce même monstre. Il faut admettre, comme nous le faisions remarquer dans les généralités sur la biologie du bacille de culture, qu'il existe des facteurs tissulaires et humoraux qui échappent à la pratique courante. Ces faits ont été amplement prouvés par les expériences de A. et L. LUMIERE, et par celles de ATA et STAIB, notamment.

La mise en évidence d'un facteur tissulaire est un travail trop important pour nous, et nous nous sommes attachés à mettre en évidence le facteur humoral, ou du moins à lui faire jouer un rôle. Pour celà nous avons pensé qu'il serait commode d'essayer de faire pousser les bacilles de certains malades, dont la streptomycino-résistance in-vitro serait bien connue, dans un milieu de TARSHIS fabriqué à partir du sang du malade lui-même. Il nous fallait donc connaître la teneur en antibiotiques du sang de ces sujets pour pouvoir corriger les pertes dues à la dilution dans une gélose glycérinée.

Ce travail comporte donc deux chapitres principaux. L'un concernant la mesure du taux d'antibiotique dans le sang circulant de ces malades, suivant le moment de la journée, l'autre concernant la culture proprement dite.

## A - LE TAUX D'ANTIBIOTIQUES SUIVANT LE MOMENT DE L'INJECTION ET SUIVANT LA TECHNIQUE

Nous nous sommes trouvé devant deux sortes de malades : ceux soignés suivant la technique préconisée dans le service, soit deux grammes de streptomycine par jour en six injections régulièrement espacées, l'autre employée dans d'autres services et comportant l'injection de un gramme de streptomycine par jour en une seule injection.

Nous devons remercier ici le corps médical du Sanatorium du PETIT-ARBOIS, et plus particulièrement son Directeur, M. le Docteur VARNERY, pour l'obligeance qu'il nous a témoigné dans la préparation de ce travail, en nous fournissant tout ce dont nous avions besoin pour cette étude. Qu'ils en soient ici chaleureusement remerciés.

Cette étude n'a pas la prétention d'avoir une valeur statistique, car elle n'a porté que sur quelques cas.

### a - Les méthodes employées :

Les prélèvements sanguins ont été effectués aux heures suivantes :

— pour les malades traités par la méthode des doses fractionnées dans le nycthémère : une demi-heure, une heure, et trois heures après une injection de 0,33 gramme de streptomycine ;

— pour les malades traités par la méthode de l'injection unique : une heure, trois heures, six heures, et douze heures après injection d'une dose de un gramme de streptomycine.

Le prélèvement a été chaque fois de dix centimètres cube de sang environ, de façon à obtenir au moins trois centimètres cube de sérum. Une fois le sang placé dans un tube stérile, on l'a laissé environ deux heures à la température du laboratoire, pour permettre une bonne coagulation, puis il a été, soit placé dans une chambre

## Dosage de la Streptomycinémie

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sérum physiologique en gouttes | O | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX |
| Strepto 5 u/c ou sérum malade en gouttes | X | IX | VIII | VII | VI | V | IV | III | II | I |
| Solution { glucose staphylo PSP en gouttes | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V |
| Dilutions finales | 10/15 | 9/15 | 8/15 | 7/15 | 6/15 | 5/15 | 4/15 | 3/15 | 2/15 | 1/15 |

(Emprunté de : J.-C. LEVADITI et B. KREIS : Techniques de laboratoire en pneumologie, collection de l'Institut Pasteur)

frigorifique en vue de conservation jusqu'au lendemain, soit centrifugé immédiatement. Dans les deux cas, le sérum obtenu a toujours été de bonne qualité et nous a permis des mesures faciles.

La mesure du taux de streptomcine a été pratiquée suivant la technique des dilutions indiquée par LEVADITI et KREIS.

Une solution de staphylocoque (souche OXFORD) est préparée par repiquage deux jours consécutifs sur eau peptonée. Au moment de l'emploi, on prépare une solution comprenant :

| | |
|---|---|
| Eau peptonée | 7 cc |
| Glucose 30 % | 1 cc |
| P.S.P. à 6 p. 1.000 | 1 cc |

à laquelle on ajoute trois à quatre gouttes d'une solution de staphylocoque OXFORD au 1/10° préparée la veille et maintenue en étuve à 37°.

On prépare d'autre part une solution étalon de streptomycine à cinq gammas par centimètre cube, par dilution.

On prépare dix tubes à hémolyse suivant les indications données par le tableau ci-joint.

On porte ensuite en étuve à 37°, et on lit les résultats à la vingt-quatrième heure.

Cette technique nous a donné toute satisfaction. On pourrait cependant lui reprocher un certain manque de sensibilité, mais sa réalisation extrêmement simple a permis des approximations suffisantes pour le travail que nous avions entrepris.

**b - Les résultats :**

Nous étudierons successivement les taux de streptomycine chez les deux groupes de malades :

— Malades traités par une seule injection par jour.

Cette étude nous a permis de constater que ces malades présentaient une streptomycinémie extrêmement élevée. En effet ,la streptomycinémie est, en moyenne une heure après l'injection de l'ordre de dix-huit gammas par

centimètre cube. Celle-ci tombe d'ailleurs rapidement, comme nous pourrons le constater encore plus loin, pour n'atteindre, à la troisième heure que le taux moyen de neuf gammas. La chute va ensuite s'amortir et à la sixième heure le taux moyen n'est plus que de trois à quatre gammas, puis de un à deux gammas à la douzième heure.

Ces chiffres sont donnés entiers, étant donné l'impression relative de la méthode employée.

Ils nous permettent toutefois de constater que, si l'on considère la streptomycinémie active comme étant au maximum de cinq gammas, ces malades ne sont protégés par des doses suffisantes que pendant cinq heures environ sur vingt-quatre, malgré la dose employée.

— Malades traités par la méthode des doses fractionnées dans le nycthémère :

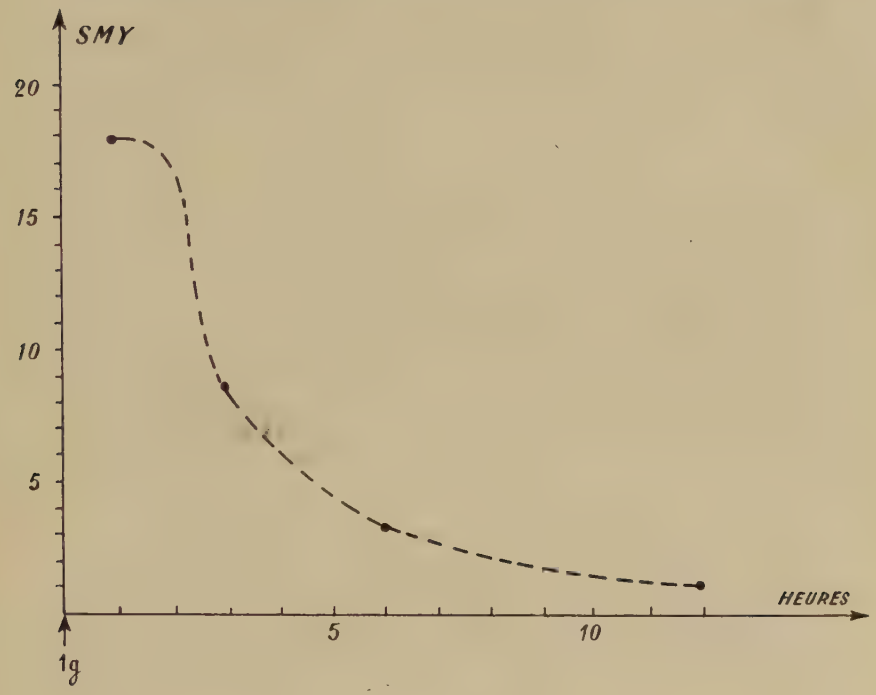
Cette étude nous a paru plus intéressante car elle nous a montré que la streptomycinémie utile tombe rapidement, ce que nous savions déjà, mais aussi que les malades réagissaient différemment aux injections.

En effet, il nous a paru intéressant de tracer deux courbes typiques, car nous avons constamment retrouvé ce phénomène. Certains malades ont des streptomycinémie que l'on pourrait qualifier d'utiles alors que d'autres ont des taux d'antibiotiques un peu limites. Ceci ne tient pas aux conditions de mesures car ces résultats nous sont apparus parfois en une seule séance pendant laquelle nous faisions plusieurs dosages de malades différents et quel que soit l'ordre employé pour faire ces dosages. On peut donc les considérer comme représentant des chiffres exacts, du moins par rapport aux autres.

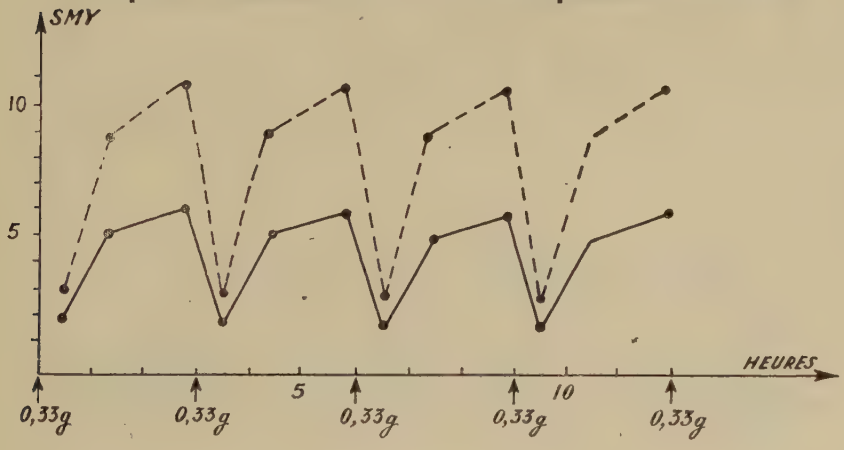
Etudions les deux séries de malades :

— 1re série : Ces malades présentent, une demi-heure après injection un taux de streptomycine de l'ordre de trois gammas. Une heure plus tard, ce taux est remonté à neuf gammas environ, pour atteindre onze gammas environ trois heures après injection de 0,33 gramme de streptomycine. On peut donc voir que ces malades sont couverts par un taux utile de streptomycine pendant la presque totalité de la journée, puisque les injections se répètent régulièrement.

**Malades traités par l'injection quotidienne unique de 1 g.**




**Malades traités par la Méthode des doses fractionnées de M. le Professeur MATTEI.**



— 2me série : Là, les malades présentent d'abord une streptomycinémie de l'ordre de deux à trois gammas, puis après une heure et demi, le taux est remonté à cinq gammas, pour atteindre à son tour le taux maximum de six gammas trois heures après l'injection. Ces malades ne semblent donc présenter une streptomycinémie active que pendant au maximum les trois quarts de la journée. Donc la streptomycinémie est ici moins importante et couvre moins le malade.

Il nous a semblé intéressant, vu le taux assez bas de la première mesure, et étant donné que nous avons pratiqué celle-ci le matin assez tôt, de vérifier la streptomycinémie une demi-heure après une injection que nous aurions vu pratiquer, ceci avec l'arrière-pensée que ce taux très bas pourrait être dû au fait que les injections de nuit n'étaient pas effectuées correctement. Cette mesure a pleinement confirmé les premiers résultats, et tout en nous rassurant quand aux injections nocturnes, nous a permis de constater que le taux de streptomycine tombait très rapidement après la troisième heure, ce qui explique l'allure de la fin de notre courbe.

Il nous a semblé que les résultats étaient fonction de l'état général des sujets. En effet les taux les plus bas nous ont été donnés par des malades dont l'intégrité hépatique et rénale était visiblement atteinte. Il serait intéressant de pratiquer à ces sujets des épreuves fonctionnelles, afin de voir, par exemple, s'il existe un rapport entre le trouble de l'élimination de la P.S.P. et le faible taux de streptomycinémie. Il serait d'autre part intéressant de faire une mesure de l'élimination urinaire de cet antibiotique en même temps qu'un dosage sanguin. Ces faits pourraient jouer, soit par le biais de l'hypersécrétion urinaire, soit par un facteur de fixation hépatique. De toute façon, ces dosages pourraient expliquer les difficultés que l'on observe à guérir les éthyliques avérés, ou du moins une partie de ces difficultés.

## B - LA CULTURE SUR LE SANG DU MALADE

Cette manœuvre demandait quelques aménagements à la technique classique de préparation du milieu de TARSHIS. Nous allons donc voir dans quelles conditions et suivant quelles techniques nous avons réalisé ce travail.

**a - Les méthodes employées :**

Nous avons recherché des malades dont nous connaissions la résistance des B. K. à la streptomycine pour en avoir pratiqué la mesure par les méthodes classiques. Il nous a fallu ensuite nous procurer ces mêmes B. K. sur lesquels on avait pratiqué la mesure de la résistance. Il a fallu enfin retrouver ces malades qui étaient bien souvent soit partis en sanatorium, soit perdus de vue.

Ceci nous a demandé pas mal de recherches et c'est là encore grâce à l'amabilité du personnel médical du Sanatorium du PETIT-ARBOIS que nous avons pu réunir ces quelques cas.

Les 7 malades étudiés dans ce paragraphe avaient des injections de streptomycine, à l'exception de tout autre antibiotique. Trois de ces malades avaient de la streptomycine sous forme d'une injection toutes les trois heures, de 0,33 gramme, les quatre autres recevaient une injection quotidienne de un gramme de streptomycine.

Les bacilles de ces sept malades étaient résistants totalement à cinquante gammas de streptomycine par centimètre cube (sur les milieux spécialement préparés à cette intention par l'Institut Pasteur de Paris) et la plupart résistaient à des doses importantes d'Isioniazide et P.A.S.

Les prélèvement ont été effectués de la façon suivante : le matin à jeun, pour avoir des conditions aussi semblables que possibles, nous avons fait un prélèvement sanguin de vingt centimètres cube environ. Dix centimètres cube étaient placés dans un tube stérile, en vue d'en extraire le sérum pour faire le dosage d'antibiotique, et dix centimètres cube étaient prélevés sur héparine pour rendre le sang incoagulable. Nous n'avons pas employé le citrate de soude car à la concentration de 5 % il inhibe deux cents gammas de streptomycine à la température de 37° en vingt-quatre heures dans une culture. L'héparine se trouvait dans la proportion d'une rinçure de seringue pour perturber le moins possible les résultats.

La réparation des milieux s'est déroulée de la façon suivante :

Nous avons préparé une eau gélosée glycérinée, comme nous l'avons indiqué plus haut, d'un volume total de deux cents centimètres cube environ. Nous l'avons portée à l'autoclave pendant un quart d'heure à 120°, puis nous l'avons laissé refroidir.

Pendant ce temps, nous avons placé dans de petites éprouvettes les dix centimètres cubes de sang hépariné, prélevés le matin même, auxquels nous avons ajouté stérilement de la pénicilline (cinquante gammas par centimètre cube) et une solution stérile de streptomycine telle que la concentration finale du milieu après adjonction de l'eau gélosée et glycérinée, soit de dix gammas par centimètre cube.

Nous avons préparé de même des milieux au sang de Centre de Transfusion, qui nous ont servi de témoins de pousse.

A sa sortie de l'autoclave, l'eau glycérinée a été placée dans un bain-marie à 45°. Après refroidissement à cette température, nous avons versé cette eau dans les éprouvettes à raison de trente centimètres cubes d'eau pour dix centimètres cubes de sang, et nous avons coulé en tubes stériles de 18, puis incliné sur des portoirs.

Les tubes ont été vérifiés et bouchés trois jours après. Nous avons prélevé quatre tubes pour chaque malade et nous avons adjoint à chaque série deux tubes de TARSHIS ordinaires dans le but de servir de témoins. Chaque tube était identifié par des étiquettes portant lisiblement le nom du malade, la date de fabrication et la nature du milieu.

L'ensemencement a été pratiqué le cinquième jour, en prenant les cultures de chaque malade, en les mettant en suspension à l'agitateur électrique et en les ensemençant sur le sang correspondant.

Les tubes ont ensuite été portés, inclinés, dans l'étuve et, après avoir été bouchés après deux jours, ont été lus tous les trois jours.

Parallèlement à cette étude, et sur les mêmes malades, nous avons pratiqué des cultures sur lames, à partir des cultures de ces malades et sur leur propre sang.

Nous avons pratiqué suivant la méthode de BERNARD et KREIS, des frottis réguliers avec des quantités de culture aussi faibles que possible sur des lames coupées en deux dans le sens de la longueur et stériles. Nous avons ensuite laissé sécher complètement, puis nous les avons plongés dans des tubes de BORREL contenant de l'acide sulfurique à 6 %, pendant sept à huit minutes. Chaque malade avait un tube de BORREL particulier. Nous avons ensuite lavé l'acide en passant deux fois les

lames dans un bain d'eau distillée stérile, en changeant le bain à chaque malade. Nous avons ensuite porté les lames dans des récipients contenant le milieu nutritif. Ce milieu était composé, dans notre cas, de sang hépariné, hémolysé par une partie égale de saponine à 1 %, streptomyciné à dix gammas par centimètre cube de milieu terminé, suivant la technique générale de PRYCE-MULLER.

Pour chaque malade, nous avons fait des lames de contrôle en nous servant de sang citraté de Centre de Transfusion pour la confection des milieux.

**b - Les résultats :**

Nous avons dressé un tableau des résultats obtenus par la méthode des cultures sur milieu de TARSHIS modifié. La lecture a été pratiquée, dans ce cas, le dix-huitième jour, après développement important des colonies.

Nous n'avons pas noté dans ce tableau les résultats des cultures sur lames, qui correspondent, grosso-modo, à ceux-ci, mais qui sont d'une interprétation beaucoup plus délicate.

Nous nous apercevrons que, pour les malades B... (1), G... (5), C... (6), A... (7), les cultures sur leur propre sang ont toujours, et pour tous les tubes, été plus ou moins nettement inférieures aux cultures sur les milieux ordinaires.

Un deuxième groupe, comprenant les malades G... (2), M... (3) et D... (4), a donné des réponses sensiblement identiques sur les milieux fabriqués avec leur propre sang et sur les milieux témoins.

Nous pouvons essayer de voir à quoi correspondent ces résultats.

Les malades G... (5), C... (6) et A... (7) sont des malades qui sont partis depuis un ou deux mois, au moment de l'expérimentation, en Sanatorium, et qui sont très améliorés par la streptomycinothérapie. Le malade B... (1) est encore hospitalisé dans le service, mais n'a pas eu de streptomycine depuis quelques mois et est actuellement traité par des injections de panthoténate de streptomycine, sans résultat bien apparent.

Les malades G... (2), M... (3) et D... (4) sont des malades très graves sur lesquels les traitements les plus divers ont

## Cultures sur Sang du Malade

| N° | Nom | T 1 | T 2 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | B. | + + + | + + | + | + | + | + |
| II | G. | + + + + | + + + + | + + + + | + + + | + + + | + + |
| III | M. | + + + + | + + + | + + + | + + | + + + | + + |
| IV | D. | + + + + | + + + + | + + + | + + + | + + + | + + + |
| V | G. | + + | + + | + | + | + | + |
| VI | C. | + + | + + | + | + | + | + |
| VII | A. | + + + + | + + + + | + + | + | + | + |

On remarquera les différences de pousses entre les témoins et les tubes au sang de malade des groupes fournis par les observations :

I, V, VI et VII, d'une part ;
II, III, IV, d'autre part.

été essayés et dont les résultats n'ont pas été très satisfaisants.

En somme, quoique tous les malades testés aient été de grands malades, les résultats de cette épreuve sont très encourageants et bien que cette étude ne soit pas assez importante pour avoir une valeur, elle laisse supposer que les facteurs humoraux dont nous avons si souvent parlé peuvent être en partie mis en évidence par ces résistances sur le sang des malades eux-mêmes et permet d'espérer que cette méthode soit plus couramment employée que les méthodes classiques auxquelles on pourrait reprocher leur trop grande impersonnalité. En effet, le fait que les B.K., qu'on avait trouvés résistants à la streptomycine à la dose de 50 gammas par les méthodes usuelles, se soient trouvés sensibles, même partiellement, à la dose de 10 gammas, prouve bien qu'il y a là quelque chose qui pourrait expliquer les discordances que l'on trouve entre les résultats fournis par le laboratoire et la clinique.

# Résistances à la D-Cyclosérine sur Milieu de Tarshis

La mesure de la résistance à la D-Cyclosérine est une épreuve qui n'est guère pratiquée actuellement, car elle s'apprécie sur des milieux liquides et à l'aide du photomètre, ce qui n'est guère commode pour une épreuve d'usage courant.

La lecture des travaux américains sur la question, les plus nombreux et les plus importants, nous a appris que la cyclosérine n'était guère stable en solution, mais qu'elle conservait cependant son activité pendant un certain temps. Les premiers, MARTIN M. CUMMINGS, PATNODE et HUDGINS, signalent que la cyclosérine peut rester quinze jours en étuve sans perdre son action bactériostatique. Par la suite, William STEENKEN J. et WOLINSKY confirment le fait. Ces différents travaux font état de milieux A.T.S. sur lesquels la cyclosérine aurait conservé son activité pendant deux semaines à la température du laboratoire, mais l'aurait perdue en partie à l'étuve. On trouvera l'unanimité faite sur l'instabilité de la cyclosérine en milieu neutre ou faiblement acide (le pH de 6,8 est cité), alors que cette même drogue serait relativement stable en solution légèrement alcaline.

Le problème, pour nous, était d'obtenir des milieux sur lesquels les colonies bacillaires se développeraient suffisamment en quinze jours pour pouvoir apprécier le degré de résistance. Ce milieu, nous l'avions avec le milieu de TARSHIS. Restait à trouver un moyen de stérilisation de la cyclosérine. La stérilisation par filtration était la seule possible, mais nous avions peur de ne pas retrouver, après cette manœuvre, la même quantité de cyclosérine qu'avant. Nous nous sommes donc fiés à notre bonne

étoile pour ne pas avoir trop de souillures. Nous verrons plus loin que nous avions raison.

La technique employée n'est certes pas très originale, mais il faut quand même la décrire pour préciser certains points au passage.

**a) La technique.**

Nous avons préparé des milieux de TARSHIS classiques suivant la méthode indiquée plus haut et nous les avons coulés dans des tubes de résistances fournis par l'Institut Pasteur, à raison de vingt-cinq centimètres cubes par tube.

Ces tubes ont été laissés, comme des milieux ordinaires, à la température de la pièce, pendant trois jours.

A ce moment-là, nous avons ajouté à ces milieux la cyclosérine. Celle-ci nous a été fournie très aimablement par les Laboratoires ROCHE, sous forme brute, mais non stérile. Nous avons donc pratiqué de la façon suivante, sans stériliser le produit : nous avons pesé le plus stérilement possible cinq cent milligrammes du produit et nous les avons mis dans deux cent cinquante centimètres cubes de sérum physiologique stérile, ce qui nous a donné la solution mère à deux mille gammas par centimètre cube, soit à raison d'un centimètre cube par tube de milieu une concentration finale de quatre-vingts gammas par centimètre cube. Nous avons obtenu ensuite toutes les autres concentrations par dilution dans du sérum physiologique. Nous sommes arrivé ainsi à faire une gamme comprenant les concentrations suivantes dans les milieux : 10, 20, 40, 60, 80 gammas par centimètre cube de milieu. La cyclosérine a été répartie dans les tubes à raison d'un centimètre cube de solution par tube. Nous avons ensuite laissé évaporer l'excès de liquide pendant vingt-quatre heures puis nous avons ensemencé immédiatement nos tubes avec un centimètre cube d'une suspension de B.K. préparée suivant la technique de TISON. Nous laissons ensuite évaporer pendant trois ou quatre jours en étuve, puis nous capuchonnons. Chaque série possède un tube témoin qui servira à apprécier la déperdition de cyclosérine, si elle existe, et qui nous servira à apprécier la résistance. La lecture est faite le quinzième jour, mais elle est déjà parfaitement possible le douzième, et même, dans certains cas, le dixième jour

## Résistances à la Cyclosérine sur Milieu de TARSHIS

| N° | Noms | T | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | G. | 50 | 50 | 50 | 50 | 25 | 0 |
| II | S. | 50 | 50 | 25 | quelques colonies | 0 | 0 |
| III | M. | 50 | 50 | 25 | quelques colonies | 0 | 0 |
| IV | B. | 50 | 50 | 15 | 1 colonie | 0 | 0 |
| V | B. | 50 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VI | C. | 50 | 10 | 1 colonie | 0 | 0 | 0 |
| VII | G. | 50 | 50 | 50 | 50 | 15 | 0 |
| VIII | B. | 50 | 10 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| IX | C. | 50 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| X | B. | 50 | 10 | 1 colonie | 0 | 0 | 0 |

Les malades I et VII ont reçu de fortes doses prolongées.

Le malade IX a reçu 300 comprimés en 3 mois.

Nous avons préféré ajouter la cyclosérine sur le milieu plutôt que de l'incorporer à celui-ci à 45°, comme le font les auteurs américains, car nous avons eu peur que le produit n'ait à souffrir de l'élévation de température et se trouve ensuite à des concentrations moindres que celles mises initialement. Cette technique est d'ailleurs inspirée de celle pratiquée par l'Institut Pasteur de Paris pour la fabrication des tubes de résistance aux antibiotiques.

Nous pensons qu'il y a intérêt à ajouter une goutte de lessive de soude à 4 % à chaque milieu, pour que celui-ci soit légèrement alcalin en vue d'une meilleure conservation de la cyclosérine. Mais ceci n'est pas indispensable, et les milieux marchent très bien sans cet artifice.

**b) Les résultats.**

Nous avons ensemencé les bacilles de dix malades. Parmi ceux-ci, certains avaient déjà eu de la cyclosérine en quantité variable, d'autres, la majorité, n'en avait jamais eu.

Les résultats ont été collectés dans un tableau identique à celui qui est distribué dans les services quand nous rendons les résultats de résistances.

Ces chiffres nous permettent de voir que presque tous les malades sont sensibles à des doses de l'ordre de 20 gammas, mais qu'à partir de 10 gammas, la pousse est nettement inférieure, donc que la sensibilité est déjà assez importante.

Nous voyons, d'autre part, que deux malades ont des pousses assez abondantes pour des concentrations de l'ordre de 60 gammas. Ces cas concernent des malades ayant reçu de la cyclosérine en quantité assez abondante et sans interruption pendant des périodes de dix et de douze mois. Ceci semble donc correspondre à des résistances biologiques établies.

Le malade C... (9) a reçu, avant son entrée dans le service, environ 300 comprimés de cyclosérine, répartis sur trois mois. Or, nous pouvons constater que sa sensibilité à ce bactériostatique est encore très bonne. Ce qui semblerait prouver que la résistance est assez longue à s'établir.

**c) Discussion.**

Cette méthode n'a pas le mérite de l'originalité, elle n'a fait que transposer sur le plan de la cyclosérine ce qui se faisait pour d'autres antibiotiques.

Toutefois, nous devons insister sur la question des souillures. Nous avons pensé, en effet, que nous ne manquerions pas d'avoir de nombreuses souillures. Or, il n'en a rien été, tant que nos tubes ont été dans l'étuve. Sur 60 tubes ensemencés, un seul a été souillé lors de l'ensemencement. Il est facile d'écarter les milieux douteux avant de mettre la cyclosérine. Par contre, nous devons signaler l'action mycostatique de la cyclosérine sur le milieu au sang au moins. En effet, les tubes une fois sortis de l'étuve, on voit apparaître des champignons à leur surface au bout de huit à dix jours environ, et ceci se voit plus fréquemment encore sur les tubes de LOEWENTEIN que sur les géloses au sang. Cette action secondaire a peut-être sauvé cette étude, mais il fallait en parler pour être complet. Signalons quand même que la rapidité dans l'exécution de toutes ces manœuvres est d'un grand secours et évite beaucoup de souillures.

Il semble que l'on ait intérêt à se servir de solutions stériles et titrées de cyclosérine, mais celles-ci ne sont pas préparables autrement qu'extemporanément et peu de laboratoires peuvent se le permettre. Alors que notre méthode est très suffisante comme approximation et que son prix de revient très bas doit en faire une méthode extrêmement pratique, qui rendra à beaucoup les immenses services qu'elle nous rend déjà.

# Conclusions

Nous avons expérimenté dans ce travail un milieu gélose glycérinée au sang, ou milieu de TARSHIS. Pour ce faire, nous avons ensemencé 612 tubes de milieux apppartenant à 97 malades différents et se décomposant ainsi : 384 milieux de LOEWENSTEIN, à titre comparatif, et 228 tubes de milieu de TARSHIS. Nous avons obtenu 284 tubes positifs, de 52 malades différents, soient : 158 tubes de milieu de LOEWENSTEIN et 126 tubes de milieu de TARSHIS.

Nous avons pu constater que les cultures sur TARSHIS étaient moins riches que celles sur LOEWENSTEIN, mais que les délais de pousse étaient plus courts. Il nous a semblé aussi que les milieux au sang donnaient avec beaucoup plus de régularité des séries complètes de tubes positifs, ce qui peut, dans une certaine mesure, compenser la pauvreté relative du milieu à un moment où le poids brut de bacilles présente un intérêt certain, quand il s'agit de pratiquer des mesures de résistance, par exemple.

Ces avantages, sa confection extrêmement simple et rapide, son prix de revient particulièrement bas, nous inclinent à penser que ce milieu a sa place dans tous les laboratoires.

Nous avons été amené ensuite à faire des dosages d'antibiotiques dans le sang de malades traités soit par une injection de un gramme de streptomicine par jour, soit par la méthode des doses fractionnées dans le nycthémère, méthode préconisée et codifiée par M. le professeur

MATTEI : deux grammes par jour en six injections régulièrement espacées. Les résultats de ces mesures nous ont montré que, dans le cas de l'injection unique, ces malades présentaient un clocher de streptomycinémie extrêmement élevé, mais que par la suite, celle-ci tombait rapidement laissant le malade avec une protection antibiotique insuffisante pendant les trois-quarts de la journée. Dans le cas des six injections de 0,33 gramme chacune, le clocher est beaucoup moins élevé, mais, par contre, la streptomycinémie active couvre le malade, dans la majorité des cas, pendant presque toute la journée. Certains malades semblent avoir une streptomycinémie moins élevée, mais cependant suffisante pour les protéger utilement pendant dix-huit heures par jour. Ceci vient donc encore à l'appui, si besoin était, de la méthode des doses fractionnées.

Nous avons ensuite pratiqué des cultures sur le sang des malades eux-mêmes, en portant la concentration sanguine de la streptomycine à 10 gammas, par centimètre cube. Nous avons ensemencé ces milieux avec les propres bacilles de ces malades, dont les épreuves de résistance avaient montré qu'ils étaient résistants totaux à la streptomycine par les moyens habituels. Les résultats, qui sont cependant trop peu nombreux pour permettre une étude statistique valable, semblent venir à l'appui d'une hypothèse qui ferait intervenir un facteur humoral dans l'action propre de la streptomycine sur le B. K., in vivo. Cette méthode nous a paru plus précise que la méthode classique de mesure des résistances sur milieux synthétiques.

Nous avons enfin pratiqué des mesures de résistance à la D-Cyclosérine sur milieu de TARSHIS. Nous avons pour cela employé une technique directement inspirée de celle couramment employée pour la mesure de la résistance aux autres antibiotiques. Cette méthode, pour sommaire qu'elle est, nous a donné des résultats très satisfaisants.

Le problème des souillures nous a particulièrement intéressé et nous les avons soigneusement notées. On peut les apprécier à un peu plus de deux pour cent, soit le double de celles obtenues sur le milieu correspondant de LOEWENSTEIN. Toutefois ces souillures ne nous ont jamais gêné et nous pensons qu'on peut encore diminuer leur nombre en faisant subir aux milieux un passage préliminaire de trois jours en étuve à trente-sept degrés avant emploi.

A la fin de ce travail, nous ne pouvons que souhaiter que ce milieu tienne dans les laboratoires, sinon la première place, du moins celle qui doit revenir à un milieu simple, peu coûteux, fidèle et donnant des résultats rapides.

Vu et Approuvé,
le Président de Thèse
Signé : C. MATTEI.

Vu et Approuvé,
le Doyen
Signé : G. MORIN.

Vu et Permis d'imprimer
Aix, le 22 juin 1957
Le Recteur,
Signé : J. BLACHE.

# Bibliographie

## I. — *GENERALITES - PRELEVEMENTS*


Barıety M. et Paillas J. — Les prélèvements bronchiques dans la recherche du bacille de Koch - *Rev. de la Tub.* 1944-45 (9), n° 11-12, 337-339.

Benard E. et Kreis B. — Etude sur des améliorations techniques proposables pour la recherche du bacille tuberculeux dans les expectorations. - *Rev. de la Tub.* 1944-45 (9), n° 11-12, 333-336.

Brocard H. et coll. — Les indications des manœuvres endobronchiques dans le diagnostic bactériologique de la tuberculose pulmonaire. - *Paris Med.* 23 juillet 1949 (39), n° 27, 339-342 (Bibl.).

Browning P., Calver K. M., et Paterson E. E. — Le « teepol » dans la préparation des crachats pour la culture du bacille tuberculeux. - *British Med. Jour.* 27 juin 1953, n° 4825, 1432.

Calmette A. — L'infection bacillaire et la tuberculose, 4me *édition revue par Boquet A. et Nègre L.* - Doin et Cie, Editeur, 1936.

Chaves A. D., Peizer L. R. et Widelock D. — Une étude comparée de l'efficacité des prélèvements laryngés et du tubage gastrique pour la détection du B. K. chez les pulmonaires. - *Amer. Rev. of Tub.* mai 1953 (67), n° 5, 598-603, 1 tabl. (bibliogr.) (résumé français).

Davy. — Avantages et inconvénients des méthodes de prélèvements employés au cours de la tuberculose pulmonaire pour la recherche de bacilles tuberculeux. *Rev. de la Tub.* 1949 (13), n° 3-4, 387.

Davy et Levaditi. — Rôle dans la centrifugation, la recherche du bacille de Koch par les procédés d'homogénéïsation. - *Ann. Inst. Pasteur* 1938 (61), n° 3, 300.

Desbordes J. — Diagnostic bactériologique des mycobactéries. - *Masson et C^ie^, Editeurs,* 1951.

Dittmar W. — Homogénéisation des crachats bacillifères au moyen d'une solution à 0,5 % de phosphate trisodique. - *Tuberkuloseartz,* avril 1956 (40), n° 4, 216-221 (résumé français).

Engbaek H. C. — A propos de la mise en évidence de B.K. dans le liquide de lavage gastrique (1). - *Acta Tub. Scand.* 1953 (28), n° 1-2, 74-99, 14 tabl., 3 fig. (biliogr.) (texte anglais).

Fourestier M. — L'enrichissement bacillaire mécaniquement provoqué des expectorations. Notre examen dit « B. K. 4 jours ». - *Poumon,* oct. 1955 (11), n° 8, 667-681 (bibliographie).

Freiman et Pinner. — Recherche systématique des bacilles acido-résistants dans l'expectoration. - *Rev. de la Tub.* 1949 (13), n° 7-8, 700-701.

Frostad S. — Valeur des méthodes de frottis laryngés et de lavage gastrique pour la mise en évidence du B. K. - *Acta Tub. Scand.* 1954 (29) n° 3, 214-222 (bibliographie).

Gernez-Rieux C., Berton A. et coll. — Intérêt du lavage bronchique pour le diagnostic et la conduite du traitement de la tuberculose pulmonaire. - *Presse Médicale,* 30 nov. 1949 (57), n° 75, 1101-1103 (bibliographie).

Gray D. F., Clarke B. L. et Johnstone W. E. — La découverte d'un petit nombre de bacille tuberculeux en diagnostic : l'action léthale des agents d'homogénéïsation. - *Amer. Rev. of Tub.* juin 1954 (69), n° 6, 991-1001 (bibliographie) (résumé français).

Hauduroy P. — Contribution au problème des formes non acido-résistantes des bactéries acido-alcoolo-résistantes. - *Rev. de la Tub.* 1949 (5), n° 2, 164-169.

Hauduroy P. — Bacilles tuberculeux et paratuberculeux. - *Masson et C^ie^, Editeurs,* 1950.

Kelly J. H. — Les prélèvements laryngiens pour le dépistage des bacilles tuberculeux chez les malades qui n'expectorent pas. - *Med. J. Austral.* 19 nov. 1955, 42/11, n° 21, 852-854 (bibliographie).

KOURILSKY et DECROIX. — A propos de l'emploi des aérosols pour la recherche des bacilles tuberculeux. - *Rev. de la Tub.* 1953 (17), n° 12, 1229-1230.

LEES A.-W., MILLER T.-J.-R. et ROBERTS G.-B.-S. — Le lavage bronchique pour le dépistage du bacille tuberculeux. - *Lancet,* 15 oct. 1955 (269), n° 6894 800-801 (bibliographie).

LEVADITI J.-C. et KREIS B. — Technique de laboratoire en pneumologie. - *Editions médicales Flammarion,* 1949.

LIND A. et LUNDIN A. — Le prélèvement laryngé, méthode de dépistage du bacille tuberculeux dans la tuberculose pulmonaire. - *Acta Tub. Scand.* 1955 (31), n° 2, 178-184 (bibliographie).

LOWYS P. — Note sur l'utilité et la simplicité du prélèvement laryngé chez l'enfant pour la recherche du B. K. et du pneumocoque. - *Rev. de la Tub.* 1949 (13), n° 162, 90-91.

MEYER L. (de SEYSSUEL). — Perfectionnement du tubage gastrique pour la recherche du B. K. : le tubage perfusion. - *Rev. de la Tub.,* 1951 (15), n° 10-11, 997-999.

SAENZ A. Jr. — Recherches sur la culture du bacille de Koch dans les mucosités laryngo-pharyngiennes prélevées par la méthode des frottis. - *Presse Médicale,* 18 mars 1953 (61), n° 19, 381-382 (bibliographie) et *Rev. de la Tub.* 1953 (17), n° 9, 926-932 (bibliographie).

TIÉON F. — Pour une standardisation des méthodes de recherche du bacille de Koch. - *Revu. de la Tub.,* 1954, 5me série (18), n° 6, 588-591.

TISON H. et AUDRIN J. — L'isolement du bacille tuberculeux à partir de produits souillés (nouvelle technique personnelle). - *Revue de la Tub.,* 1955 (19), n° 3, 197-205 (bibliographie).

TISON H. et AUDRIN J. — Recherche, étude et ensemencement du bacille tuberculeux. - *Masson et Cie, Editeurs,* 1956.

VIDAL J., SALAGER J. et coll. — Contribution de la bronchoscopie au diagnostic de la tuberculose pulmonaire. *Montpellier Médical,* mars 1954 (97), n° 3, 246-252 (bibliographie), et *Marseille Médical,* 1954 (91), n° 2, 92-98.

WALLACE A.-T., ROSS J.-D. et SCHILLER E. — Les prélèvements d'exsudats laryngés pour l'isolement du bacille tuberculeux. - *Brit. J. Tub.*, juillet 1955 (49), n° 3, 225-230.

WALDRIP B. et coll. — L'emploi combiné du lavage de la trachée et de la culture à partir de la trachée en tant que procédé de diagnostic de la tuberculose pulmonaire. - *Amer. rev. of Tub.*, nov. 1949 (60), n° 6, 634-638 (bibliographie).

## II. — *CULTURES*

Adler, Toman et Tomanova. — Culture d'écouvillonnage amygdalien dans la tuberculose pulmonaire. - *Acta Tub. Scand.*, 1950 (1), 78, et *Rev. de la Tub.*, 1951 (15), n° 3, 311-312.

Barry V.-C., Conalty M.-L., Denneny J.-M., Gaffney E.-E. et Winder F. — Etude sur des souches isionazido-résistantes de M. tuberculosis : conditions nécessaires au développement de souches résistantes à 100 gammas d'isionazide par ml. - *Amer. rev. of Tub.*, juin 1955 (71), n° 6, 785-798 (bibliographie) (résumé français).

Bekierkunst A. — Cultures de bacilles tuberculeux en athmosphère enrichie en gaz carbonique. - *Schw. Zeitschr. für Allgemeine Pathologie und bacteriologie*, 1957, n° 2, 161-163.

Bernard E., Kreis B. et Lejoubioux E. — Sur les bacilles tuberculeux de faible virulence isolés après traitement par l'isoniazide. - *Rev. de la Tub.*, nov. 1955 (19), n° 10-11, 1113-1114, 12 tabl. (bibliographie).

Brouet G., Marche J., Paley P.-Y. et Mme Mallet J. — Etude de la croissance du bacille de Koch en milieu synthétique et en présence de différents antibiotiques. *Rev. de la Tub.*, 1953 (17), n° 3, 274-285, 9 fig.

Browning P., Calver K.-M. et Paterson E.-E. — Le teepol dans la préparation du crachat destiné à la culture du bacille tuberculeux. - *British Med. Jour. Londres*, 27 juin 1953, n° 4825, p. 1432.

Bunn P.-A., Robinson F. et Osborne W. — Emploi d'embryon de poulet en tant que milieu pour la culture rapide des B. K. - *J. Lab. Clin. Med.* avr. 1955 (45), n° 4, 658-660 (bibliographie).

Cabelli V.-J., Elliot W.-E. et Moelroy R.-J. — Recherches culturales sur les bacilles chromogènes acido-résistants en insistant sur leurs besoins en oxygène. -

*Amer. Rev. of Tub.*, avr. 1954 (19), n° 4, 604-611 (bibliographie) (résumé français).

Cascio G. et Purpura R. — Virulence des souches de B.K. par rapport à leur sensibilité pour la streptomycine. - *Minerva Ped.* 15 août 1954 (6), n° 15, 597-600 (bibliographie) (résumé français).

Chstnick I. — Observations sur le pouvoir pathogène des souches de bacilles de Koch résistants à l'hydrazide de l'acide isonicotinique dans la tuberculose expérimentale. - *Tuberkulosearzt,* mars 1955 (9), 136-139 (résumé français).

Chu L.-S. — Une méthode rapide de culture des bacilles acido-résistants. - *Sciences,* 16 déc. 1955 (122), n° 3181, 1189-1190.

Collins C.-H. — L'emploi des milieux de Dorset, de Corper Cohn et de Lœwenstein-Jensen dans les cultures pour le diagnostic du B. K. - *Acta Tub. Scand.,* 1952 (27), n° 1-2, 66-76.

Czanick P., Szabo I. et Vincze E. — Recherches sur la virulence des mycobactéries de souche tuberculeuse artificiellement cultivées pour la grande résistance. - *Beitr. Klin. Tub.,* 1955 (114), n° 3, 304-308.

Fischer M.-W. — L'hémine comme facteur de croissance pour certaines souches isoniazido-résistantes du mycobactérium tuberculosis. - *Amer. rev. of Tub.,* mai 1954 (69), n° 5, 797-805 (bibliographie) (résumé français).

Gauthier J.-A. — Contribution à l'étude de la fixité de la résistance acquise aux antibiotiques des germes pathogènes et du bacille de Koch en particulier. - *Thèse Paris,* février 1954 (92), 50 pages.

Halpern B. et Kircheimer W.-F. — Etude sur la croissance des mycobactéries : effets de l'oxygénation et de l'aération sur les modalités de croissance des mycobactéries. - *Amer. rev. of Tub.,* oct. 1954 (70), n° 4, 665-671, (résumé français).

Hirsch J.-G. — Milieux au charbon pour la culture du bacille tuberculeux. - *Amer. Rev. of Tub.,* déc. 1954 (70), n° 6, 955-976, 7 fig. (bibliographie).

Hirsch J.-G. — Recherche sur les facteurs de croissance du jaune d'œuf agissant sur le bacille tuberculeux. - *Amer. Rev. of Tub.,* déc. 1954 (70), n° 6, 988 (bibliogr.)

Hobby G.-L., Auerbach O., Lenert T.-F., Small M.-J. et Comer J.-V. — Apparition tardive de M. tuberculosis dans les cultures liquides de lésions pulmonaires réséquées chez l'homme. - *Amer. Rev. of Tub.* août 1954 (70), n° 2, 191-218, 3 tabl. (bibliographie) (résumé français).

Hurwitz C., Snelson S. et Abramowitz S. — Variations dans l'aptitude d'une souche de Mycobactérium Tuberculosis à utiliser l'asparagine comme unique source d'azote pour sa croissance. - *Amer. Rev. of Tub.*, juillet 1953 (68), n° 1, 127-135, 3 fig., 5 tabl. (bibliographie).

Hutinel P. — Des caractères distinctifs des mycobactéries non pathogènes isolées de l'expectoration des tuberculeux pulmonaires. - *Thèse Lyon,* 9 juillet 1954, n° 189.

Maasen W. et Dietz H. — La méthode des cultures offre-t-elle des avantages par rapport à la méthode microscopique dans l'examen des crachats ? - *Beitr. Klin. Tub.* 1954 (112), n° 1, 5-13 (bibliographie).

Meyer A., Galland R. et Kobrinsky B. — Résultats comparés de la culture et de l'examen sur lames pour la recherche des B.K. - *Rev. de la Tub.* 1951 (15) n° 10-11, 932-941.

Middlebrook G. et Cohn M.-L. — Quelques observations sur l'effet pathogène de quelques variétés de B. K. résistants à l'isoniazide. - *Sciences,* 11 sept. 1953 (118), n° 3063, 297-299 (bibliographie).

Tison F. — Sensibilité comparée de la culture et de l'inoculation au cobaye pour la recherche des B. K. - *Rev. de la Tub.* 1949 (13), 3-4, 387, et *Sem. Hop. Paris,* 1949 (9), 389.

Tison F. — La culture du bacille de Koch dans les crachats, en pratique courante. - *Rev. de la Tub.* 1953 (17), n° 9, 943-958 (bibliographie).

Whalen J.-W. et Mallmann W.-L. — Milieu au charbon-agar pour la culture du Mycobactérium tuberculosis. - *Amer. Rev. of Tub.* mars 1955 (71), n° 3, 382-389 (bibliographie) (résumé français).

## III. — *MILIEUX AU SANG*

Bastin R. — La culture du bacille tuberculeux : remarques surs l'action de sérum sanguin, du sang total et de ses constituants. - *Sem. Hop. Paris*, 26 août 1949 (25), n° 2645-2649 (bibliographie).

Bojatil L.-F. et Liado H. — Estudio sobre el medio de gelosa sangre para el cultivo de Mycobactérium tuberculosis. - *Rev. Mexicana Tub. et Apar. Respir.* 1955 (16), 94-112.

Burns L. et Fleischmann W. — Tr. of fourteenth Conference on the chemotherap of tuberculosis, Veterans administration. - *Army, Navy, Atlanta, Georgia*, pp. 267.

Choremis C. et Danelatou. C. — Etudes comparatives sur la culture de bacille de Koch et la moëlle osseuse, du sang et du suc gastrique. - *Acta Péad.* sept. 1953, (42) n° 5, 428-430-431 (bibliographie) (résumé français).

Clark M.-E. — Human plasma and blood agar for cultivation of tubercle bacilli. - *Amer. J. Clin. Path.* 1953 (23), 671-675.

Das Neves et Da Alemquer M. — Comparaison des résultats obtenus avec des milieux gélose-sang et de Loewenstein pour l'isolement du Mycobactérium tuberculosis. - *C. R. Soc. Biol.* 1956, 149/19-20, 1840-1842.

Dionne P., Landry J. et Leblanc G. — La culture du B. K. mise à la portée de tous les laboratoires par l'utilisation d'un milieu au sang. - *Union Med. Canada* av. 1955 (84) n° 4, 404-407 (bibliographie).

Frish A.-W. et Tarshis M.-S. — Les milieux sanguins pour la culture du bacille tuberculeux. Leur évaluation par une méthode de dilutions en séries. - *Amer. Rev. of Tub.* nov. 1951 (64), n° 5, 551-556 (bibliographie).

HINGLAIS H., HINGLAIS M. et LANGLADE M. — Cultures du bacille de Koch sur milieux au sang de diverses espèces. Essai d'une nouvelle méthode de différenciation accélérée du bacille humain et du bacille bovin. - *Presse Méd.* 16 mai 1956 (64) n° 39, 910 (bibliographie).

KAUFFMAN W. et REINISH E. — Cultivation of human and bovine strains of mycobactérium tuberculosis on blood mediums. - *Am. J. Clin. Path.* 1954 (24), 74-75.

KINSELLA P.-C. et PARKER M.-V. — Blood media for the cultivation of Mycobacterium tuberculosis. Comparaison of blood agar penicillin and Loewenstein-Jensen media under routine diagnostic conditions. - *J. Bact.* 1953, (66), 448-452.

KNOX R. — Des milieux d'agar semi-solides pour la culture rapide du bacille tuberculeux. - *Lancet,* 16 juillet 1955, (269), n° 6881, 110-112 (bibliographie).

LO MONACO. — Esperienze sull'impiego di un terreno al sangue per la coltivazione del Mycobacterium tuberculosis. - *Boll. Ist. Sieroter.* Milan 1955, 34/7-8, pp. 453-467.

NINNI et BRETEY. — *C. R. Soc. Biol.,* 1953, (1113), p. 572.

REINISH E. — Blood mediums for toutine cultivation of tubercle bacilli. - *Amer. J. Clin. Path.* 1953 (23), 929-932.

REINISH E.-M. et KAUFFMANS W. — Penicillin blood agar medium for use in routine diagnostic cultivation of Mycobacterium tuberculosis. - *J. Lab. Clin. Med.* 1955 46/2, pp. 329-332.

SOULA-DUBIE A. (M^me^). — Culture des bacilles de Koch et tuberculose pulmonaire. - *Thèse Toulouse,* mai 1954, n° 22.

STADTSBAEDER S. et De SOMER P. — L'isolement et le développement du bacille tuberculeux. - *Acta Tub. Belg.* 1955, 46/2, pages 84-90.

TARSHIS M.-S. — Blood media for the cultivation of Mycobacterium tuberculosis : effect of adding penicillin. - *J. Lab. Clin. Med.* 1952, (40), 628-633.

TARSHIS M.-S. — Blood mediums for cultivation of Mycobacterium tuberculosis : results with agar-agar basal medium and varying concentrations of blood, glycerine and penicillin. - *Amer. J. Clin. Path.* 1953 (23), 661-670.

TARSHIS M.-S. — A simple blood medium for détermining the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid (isonicotinic acid hydrazide). - *J. Bacter.* 1954, (67), 117-122.

TARSHIS M.-S. et FRISH A.-W. — Blood media for the cultivation of Mycobacterium tuberculosis. - *Amer. J. Clin. Path.* 1951 (21), 101-113.

TARSHIS M.-S. et FRISH A.-W. — Blood media for determination of sensitivity of Mycobacterium tuberculosis to streptomycin. - *Amec. J. Clin. Path.* 1951 (21), 729-736.

TARSHIS M.-S., PARKER M.-V. et DUNHAM W.-B. — Les milieux sanguins pour la culture de Mycobacterium tuberculosis. - *Acta Tuber. Scand.* 1954 (30) n° 1-2, 37-42.

TARSHIS M.-S. et WEED W.-A. — Lack of significant in vitro sensitivity of mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide on three different solid media. - *Amer. Rev. tub.* 1953, (67) 391-395.

TARSHIS M.-S., WEED W.-A. et DUNAM W.-B. — Blood mediums for cultivation of mycobacterium tuberculosis : results with outdated human bank and deshydrated bovine blood mediums, with and without penicillin and comparison with the A.T.S. and Loewenstein-Jensen medium. - *Acta Tub. Scand.* 1956 (32) n° 1, 55-62 (bibliographie).

VISCHER W.-A. — Utilisation d'un simple milieu de culture à l'agar et au sang en tant que terrain pour la détermination de la résistance des bacilles de Koch à la chimiothérapie antibiotique usuelle. - *Rev. Suisse Tub.* 1956 (13), n° 1, 34-41 (bibliographie) (résumé français).

WEED M.-A., KINSELLA P.-C., PARKER M.-V. et DTNHAM W.-B. — Further experiences with a new blood medium for the cultivation of Mycobacterium tuberculosis. - *Amer. J. Pub. Health* 1955 (45), 1157-1161.

WEED M.-A., PARKER M.-V. et DUNHAM W.-B. — Chromogenic acid-fast bacilli from human sources. In vitro responses to a number of antimicrobial agents on glycerol-blood-agar medium. - *Amer. Rev. Tub.* 1955, (72), 119-122.

YOUMANS A.-S. et YOUMANS G.-P. — *J. Bact.* 1950 (60) pp. 561.

## IV. — *RESISTANCE A LA CYCLOSERINE*

Anderson R.-C., Worth M.-M., Welles J.-S., Harris P.-N et Kchen K. — Pharmacology and toxicology of cycloserine. - *Antibiotics and chemotherapy* 1956, (6), n° 5, 360-368.

Barclay W.-R. et Russe H. — The in vitro action of cycloserine on mycobacterium tuberculosis. - *Amer. Rev. Tub.* 1955, (72), 236-241.

Bartmann K. — Une modification du procédé standard pour la détermination de la résistance des bacilles de Koch qui permet d'économiser du travail et du milieu de culture. - *Tuberkulosearzt,* av. 1954, (8), n° 4, 244-245.

Cuckler A.-C., Frost B.-M., McClelland et Solotorovsky M. — The antimicrobial évaluation of Oxamycin, a new broad-spectrum antibiotic. - *Atnbiotics and Chemotherapy* 1955, n° 5, 191-197.

Cummings M.-M., Patnode R.-A. et Hudgins P.-C. — Effects of cycloserine on mycobacterium tuberculosis in vitro. - *Antibiotics and Chemotherapy* 1955, (5), n° 4.

Hackl H. — A propos de l'utilisation élargie et de l'appréciation scientifique de la détermination de la résistance des cultures sur lames. - *Beitr. Klin. Tub.* 1955, (113), n° 4, 292-300 (bibliographie).

Hudgins P.-C., Patnode R.-A. et Cummings M.-M. — The effects of cycloserine on growing and resting tubercle bacilli. - *Americ. Rev. Tub.* nov. 1955 (72) n° 5, 685-686.

Illemen-Larsen G. — Détermination de la résistance des B.K. dans les crachats, en particulier par la méthode de Pryce. - *Acta Tub. Scand.* 1953, (28) n$^{os}$ 3-4, 325-339 (bibliographie) (texte anglais).

Jacquet-Desmoulin G. (M$^{me}$). — Etude de la croissance du bacille de Koch en milieu synthétique et en présence de différents antibiotiques. - *Thèses Paris* 1953, n° 84, 26 pages.

Jones L.-R. — Colorimetric détermination of cycloserine, a new antibiotic. - *Analytical chemistry,* janvier 1956 (28), pp. 39.

Morton R.-F., McKenna M.-H. et Charles E. — Studies on the absorbtion, diffusion and excretion of cycloserine. - *Antibiotics annual* 1955/56, pp. 169-172.

Nair K.-G.-S., Epstein I.-G., Baron H. et Mulinos M.-G. — Absorbtion, distribution and excretion of cycloserine in man. - *Antibiotics annual* 1955-56, pp. 136-140.

Ravina A. — Un nouvel antibiotique : la cyclosérine. - *Presse Méd.,* 9 av. 1955, (63), 26, 532 ; *Vie Méd.,* sept. 1955, n° 9, 1023 ; *Rev. de la Tub.,* 1955, (19), n° 4, 485.

Renzetti A.-D., Wright K.-W., Edlings J.-H. et Bunn P. — Clinical bacteriologic and pharmacologic observations upon cycloserine. - *Amer. Rev. of Tub.* juil. 1956 (74), n° 1, 128-135.

Shmedel A. — Un procédé par zones inhibitrices pour l'évaluation de la résistance des B.K. - *Beitr. Klin. Tub.,* déc. 1954 (112) n° 6, 475-482 (bibliographie).

Steenken W. Jr. et Wolinsky E. — Cycloserine : antituberculous activity in vitro and in the expérimental animal - *Amer. Rev. of Tub., ov* 1956 (73), n° 4, 539-546, *in Rev. de la Tub. av.* 1956 (20), n° 4, 443.

Sutton W.-B. et Stanfield L. — The reversal of cycloserine inhibition by Mycobactin, a gavth factor for Mycobacteria. *Antibiotics and Chemotherapy,* oct. 1955, (5), n° 10, 582-584.

Welch H., Putnam L.-E. et Randall W.-A. — Antibacterial activity and blood and urine concentrations of cycloserine, a new antibiotic, following oral administrations. - *Antibiotic Medecine,* fév. 1955 (I), n° 2, pp. 72-79.

## TABLE DES MATIERES


1 — PREAMBULE ..... 1

2 — HISTORIQUE DES MILIEUX DE CULTURE .... 5

a - Les travaux initiaux ..... 7
b - La période des milieux synthétiques ..... 8
c - La période analytique ..... 9
- les milieux synthétiques liquides ..... 9
- les travaux sur le sang ..... 9
- Jensen améliore le LOEWENSTEIN ..... 10
d - Le renouveau du milieu au sang ..... 10

3 — LA BIOLOGIE DU BACILLE TUBERCULEUX DE CULTURE ..... 13

a - Le B. K. de culture ..... 15
b - Les éléments du métabolisme bacillaire .... 20
- le carbone ..... 20
- l'azote ..... 21
- les oligo-éléments ..... 22
- le problème de l'oxygène ..... 23

4 — LES TECHNIQUES EMPLOYEES DANS CETTE ETUDE ..... 25

a - Prélèvement des expectorations ..... 27
- tubage gastrique ..... 28
- expectorations mécaniquement provoquées 29
- manœuvres intrumentales ..... 29
b - Homogénéïsation et préparation du culot .. 30
c - Fabrication du milieu ..... 32
d - La mise en culture et la lecture des résultats 33

5 — **LES RESULTATS** ..... 35

a - Les différents aspects des colonies ..... 37
- microcolonies ..... 38
- macrocolonies ..... 38
- conclusions ..... 39

b - Les délais de pousse comparés ..... 40

c - La richesse respective des milieux ..... 47

d - Remarques générales ..... 48

6 — **CULTURES SUR LE SANG DES MALADES** .... 53

a - Mesure du taux d'antibiotique ..... 56
- les méthodes employées ..... 56
- les résultats ..... 59

b - Culture sur le sang des malades ..... 63
- les méthodes ..... 64
- les résultats ..... 66

7 — **RESISTANCE A LA CYCLOSERINE SUR MILIEU DE TARSHIS** ..... 71

a - La technique ..... 74

b - Les résultats ..... 77

c - Discussion ..... 78

8 — **CONCLUSIONS** ..... 79

9 — **BIBLIOGRAPHIE** ..... 85

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

— Délais de pousse comparés ..... 41
— Pourcentage de tubes positifs dans les différentes séries 45
— Richesse respective des milieux ..... 49
— Dosage de la streptomycinémie ..... 57
— Courbes de streptomycinémie ..... 61
— Cultures sur sang de malades ..... 67
— Résistance à la D-Cyclosérine sur milieu de TARSHIS 75

# Serment d'Hippocrate

*En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers Condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate,*

*Je promets et je jure, au nom de l'Etre Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.*

*Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.*

*Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes Confrères si j'y manque.*